



*medicinski razgledi*

Med Razgl | Letnik 49 | Številka 1



Strani

Od 1–126

- |     |  |
|-----|--|
| 1   | ▶ Uvodnik  |
| 3   | ▶ Vpliv taktilne stimulacije na fiziološke parametre, vedenje in ritem telesne aktivnosti novorojenčka – Ana Drole Torkar, Darja Paro Panjan |
| 11  | ▶ Biološka zdravila pri zdravljenju astme – Vojko Berce, Ivan Krajnc, Uroš Potočnik  |
| 19  | ▶ Citopatološka diagnostika raka sečnega mehurja v urinu in izpirku iz sečnega mehurja – Margareta Strojanc Fležar                           |
| 33  | ▶ Bioterorizem – Tatjana Pokrajac  |
| 43  | ▶ Simfonija bolezní – poklicne bolezní glasbenikov – Nina Hojs, Marjan Bilban  |
| 51  | ▶ Tesnostične pregrade v našem telesu – Kristijan Jezernik, Mateja Erdani Kreft  |
| 63  | ▶ Molekularni mehanizmi tvorbe zasevkov – Petra Hudler   |
| 77  | ▶ Avtofagija in njena vloga v zdravju in bolezní – Andreja Erman, Kristijan Jezernik   |
| 89  | ▶ Zlom obraznih kostí z ogrožajočim podkožnim emfizemom vratu in pneumomediastinomom – Jože Vogelcnik, Vojko Didanovič, Andrej A. Kansky     |
| 97  | ▶ Nefrotski sindrom v otroštvu – prikaz primera – Maja Pavčnik - Arnol, Rina Rus   |
| 107 | ▶ Poročila   |
| 113 | ▶ Novice   |
| 121 | ▶ Seznam diplomantov   |

Strani

Od 1–126

1	▶ Uvodnik
3	▶ Vpliv taktilne stimulacije na fiziološke parametre, vedenje in ritem telesne aktivnosti novorojenčka – Ana Drole Torkar, Darja Paro Panjan
11	▶ Biološka zdravila pri zdravljenju astme – Vojko Berce, Ivan Krajnc, Uroš Potočnik
19	▶ Citopatološka diagnostika raka sečnega mehurja v urinu in izpirku iz sečnega mehurja – Margareta Strojnar Fležar
33	▶ Bioterrorizem – Tatjana Pokrajac
43	▶ Simfonija bolezní – poklicne bolezni glasbenikov – Nina Hojs, Marjan Bilban
51	▶ Tesnostične pregrade v našem telesu – Kristijan Jezernik, Mateja Erdani Kreft
63	▶ Molekularni mehanizmi tvorbe zasevkov – Petra Hudler
77	▶ Avtofagija in njena vloga v zdravju in bolezni – Andreja Erman, Kristijan Jezernik
89	▶ Zlom obraznih kostí z ogrožajočim podkožnim emfizemom vratu in pnevmomediastinomom – Jože Vogelnik, Vojko Didanovič, Andrej A. Kansky
97	▶ Nefrotski sindrom v otroštvu – prikaz primera – Maja Pavčnik-Arnol, Rina Rus
107	▶ Poročila
113	▶ Novice
121	▶ Seznam diplomantov



## Uvodnik

Pred vami je prva številka novega, že 49. letnika Medicinskih razgledov. Loči nas samo še eno leto do jubilejne 50. obletnice. A do takrat bo še veliko dela in novih izzivov. V tem uvodniku predstavljam pregled dogodkov prejšnjega leta in predvsem načrte za v prihodnje.

V lanskem letu smo ponovno ujeli redni termin izhajanja naše revije. Pripravili smo posebno tematsko številko s področja toksikologije in z njo vsaj nekoliko pokrili praznino v literaturi, ki je bila na tem strokovnem področju v slovenskem jeziku. Poleg rednih številk smo v preteklem letu uredili in natisnili kar šest supplementov. Z velikim veseljem pa sporočam, da smo skupaj z avtorjema Darjo Paro Panjan in Davidom Neubauerjem pripravili in založili prenovljeno in razširjeno drugo izdajo knjige Nevrološki pregled novorojenčka.

Nismo pa se ukvarjali samo z založništvom. Spomladi smo predstavili popolnoma prenovljeno spletno stran revije ([www.medrazgl.si](http://www.medrazgl.si)), na kateri lahko poleg drugih stvari najdete arhiv člankov, objavljenih v Medicinskih razgledih. Od leta 1994 naprej so vsi članki, z izjemo najnovejših dveh letnikov, na voljo v celoti v formatu pdf. Organizirali smo tudi dva pomembna dogodka. V novembru so pod naslovom Kako pisati medicinske prispevke? potekala predavanja in delavnice, na katerih so študentje, zdravniki, farmacevti in drugi zainteresirani na praktičen način izvedeli, kaj vse obsega priprava članka. Decembra smo organizirali tudi Študentski medicinski raziskovalni kongres, na katerem so študentje Medicinske fakultete v Ljubljani in Mariboru ter Biotehniške fakultete predstavili rezultate svojega raziskovalnega dela.

S trdim delom nadaljujemo tudi v letošnjem letu. Zelo nas veseli, da se število prispevkov, poslanih v naše uredništvo, povečuje. V lanskem letu smo tako prejeli dvakrat več prispevkov kot pred tremi leti. To je razlog, da smo se odločili, da bomo letos povečali obseg revije. Namesto običajnih osem bomo v tem letniku objavljali kar deset člankov v posamezni številki Medicinskih razgledov. Prav tako pa že s polno paro pripravljamo novo tematsko številko, ki bo luč sveta ugledala ob koncu leta. Letošnja tema je prebavna cev.

V uredništvu revije smo posodobili Navodila sodelavcem, ki jih najdete na koncu revije.

Navodila so bila že krepko potrebna prenove, saj so bila nespremenjena vse od leta 1997. V tem času so se precej spremenile smernice za navajanje literature (*Citing Medicine – NLM Style Guide for Authors, Editors and Publishers*). Poleg nekaj manjših podrobnosti se pomembne spremembe nanašajo predvsem na navajanje spletnih virov. Tudi na tem področju moramo spremljati novosti in iti v korak s časom. Upam, da avtorjem in drugim sodelavcem nova navodila ne bodo povzročala večjih preglavic.

Neobhodni del izdajanja katere koli revije pa so tudi finance. Kljub vsesplošni krizi tiskanih medijev se Medicinski razgledi še kar dobro držimo. Ponosni smo, da se število naročnikov povečuje, saj nam to daje dodatno energijo in motivacijo za delo. Čeprav so se stroški izdelave revije od leta 2007, ko se je višina naročnine nazadnje spremenila, zvišali že za več kot 30 %, bo v tem letu cena revije ostala nespremenjena. Želimo si, da bi bili Medicinski razgledi še naprej na voljo po čim bolj dostopni ceni. Še posebej velja to za študente, za katere je letna naročnina izdatno subvencionirana. Za izpolnitev tega cilja smo in bomo še več pozornosti namenili pridobivanju sredstev iz najrazličnejših virov.

Ob rednem izdajanju revije pa bomo organizirali tudi različne strokovne dogodke. Tudi letos bomo pripravili predavanja s področja pisanja medicinskih člankov. Ob koncu leta pa bomo ponovno organizirali Študentski medicinski raziskovalni kongres, ki je edini študentski kongres na področju biomedicinskih znanosti v Sloveniji. Letos bomo k sodelovanju ponovno povabili študente in njihove mentorje z vseh fakultet v Sloveniji, ki se ukvarjajo z raziskovalno dejavnostjo na tem področju. Pričakujemo velik odziv, predvsem pa vzpostavitev novih medosebnih vezi na tem interdisciplinarnem področju.

Na podlagi vsega zgoraj zapisanega polni zaupanja in veselja vstopamo v novo leto. Misli pa nam uhajajo že nekoliko dlje v prihodnost, saj bo že naslednje leto jubilejno – 50. letnica Medicinskih razgledov! Do takrat pa uživajte ob prebiranju naše revije!

Klemen Žiberna,  
glavni urednik



Ana Drole Torkar<sup>1</sup>, Darja Paro Panjan<sup>2</sup>

# Vpliv taktilne stimulacije na fiziološke parametre, vedenje in ritem telesne aktivnosti novorojenčka<sup>3</sup>

*The Effect of Tactile Stimulation on Physiological Parameters, Behavioural Response and Phase Adjustment of Rest-activity Rhythms in Newborn Infants*

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** novorojenček, taktilna stimulacija, vedenje, aktimetrija, cirkadiani ritmi

**IZHODIŠČA.** Taktilna stimulacija pri otrocih vpliva na upad stresnih vedenj, izboljšanje pljučne funkcije, boljše pridobivanje na teži, mineralizacijo kosti, na izide razvojnih testiranj, optimalnejšo organizacijo spanja ter na kvaliteto zgodnje navezave med otrokom in starši. Želeli smo opredeliti varnost uporabe tovrstne stimulacije ter preveriti njene učinke na fiziološke parametre, vedenje in organizacijo ritma telesne aktivnosti pri novorojenčku. **METODE.** V raziskavo smo vključili 22 novorojenčkov, katerih postmenstrualna starost je ustrezala 37–42 tednom, povprečna starost ob vključitvi v raziskavo je bila 20,09 dni (min = 9 dni, max = 47 dni, SD = 9,68). Otroci so prejeli 15-minutne taktilne stimulacije v treh zaporednih dneh. Spremljali smo frekvenco srca ter nasičenost hemoglobina s kisikom. Pred taktilno stimulacijo ter po njej pa smo preverili spremembe v arterijskem pritisku in telesni temperaturi ter ocenili vedenje po Shemi za opazovanje novorojenčkovega vedenja. Telesno aktivnost smo spremljali aktimetro, tri dni pred stimulacijami ter tri dni po njih. **REZULTATI.** Maksimalna frekvenca srca na prvi dan je po stimulaciji porasla (Wilcoxonov test,  $p = 0,016$ ), povečala se je tudi povprečna frekvenca srca po stimulaciji na tretji dan ( $p = 0,012$ ). Nismo zaznali razlik v povprečni nasičenosti hemoglobina s kisikom, arterijskem pritisku in telesni temperaturi. Zaznali smo porast samoregulacijskih vedenj po stimulaciji (Wilcoxonov test za prvi dan:  $p = 0,018$ , tretji dan:  $p = 0,016$ ) ter stresnih vedenj na tretji dan ( $p = 0,030$ ). Izmerjena telesna aktivnost ponoči (20h–8h) je bila po stimulaciji značilno nižja, podnevi (8h–20h) pa značilno višja ( $p < 0,01$ ). **ZAKLJUČKI.** Taktilna stimulacija ne povzroča nestabilnosti fizioloških parametrov, vpliva na večjo zastopanost samoregulacijskih vedenj v primerjavi s stresnimi ter na boljšo organiziranost ritma telesne aktivnosti.

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** newborn, tactile stimulation, behaviour, actigraphy, circadian rhythms

**BACKGROUND.** Infant tactile stimulation reduces distress behaviours, improves pulmonary function, weight gain per day, bone mineralization, developmentally appropriate functioning,

<sup>1</sup> Ana Drole Torkar, abs. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; a\_drole@yahoo.com

<sup>2</sup> Doc. dr. Darja Paro Panjan, dr. med., Klinični oddelek za neonatologijo, Pediatrična klinika Ljubljana, Bohoričeva 20, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Objavljeno je delo, ki je bilo nagrajeno s fakultetno Prešernovo nagrado za študente v letu 2008

enhances sleep organization and early attachment between infant and parents. We wanted to investigate the effect of tactile stimulation on physiological stability, behavioural response and phase adjustment of rest-activity rhythms to the nocturnal period in full-term infants. **METHODS.** Study population consisted of 22 newborns, whose postmenstrual age corresponded to 37–42 weeks, mean age at the day of inclusion was 20,09 (min = 9 days, max = 47 days, SD = 9,68). Children were given 15 minute tactile stimulations on three subsequent days. Stability of physiological parameters was recorded using cardiorespirography, blood pressure and body temperature were recorded before and after stimulation and infant's behaviour was observed according to Naturalistic Observation of Newborn Behaviour Sheet. Rest-activity cycles were measured actigraphically from three days prior to, until three days after stimulation procedures. **RESULTS.** After stimulation maximal frequency of heartbeat on day one accelerated (Wilcoxon's test,  $p = 0,016$ ), and so did the mean frequency of heartbeat on day three ( $p = 0,012$ ). Differences in hemoglobin oxygen saturation, blood pressure and body temperature were all statistically insignificant. Newborns exhibited more selfregulatory behaviors after stimulation (Wilcoxon's test, first day  $p = 0,018$ , third day  $p = 0,016$ ) and also more stress behaviors (third day:  $p = 0,030$ ). Activity index was significantly higher for the daytime ( $p < 0,01$ ) and lower for the night time period ( $p < 0,01$ ) after short term tactile stimulation. **CONCLUSIONS.** Tactile stimulation is a safe method. Newborns showed more selfregulative than stress behaviour. After short term tactile stimulation infants showed a favourable adjustment of rest-activity cycles.

## UVOD

Za uporabo dotika v terapevtske namene se uporabljajo izrazi taktilna oz. kinestetična stimulacija (TS), tudi masažna terapija (1). TS opredeljujemo kot sistematično manipulacijo mehkih tkiv telesa, ki vključuje držanje, premikanje ter aplikacijo pritiska na telo (2). TS je v vseh starostnih skupinah ena najpogostejše uporabljanih dopolnilnih terapij, še posebej v populaciji z zdravstvenimi ali razvojnimi težavami (2, 3).

V raziskavah, v katere so bili vključeni otroci, so dokazali, da TS zmanjša pojavnost stresnih vedenj, pomembno izboljša pljučno funkcijo pri astmi in cistični fibrozi, preko povečane sinteze proteinov, vagalne aktivnosti ter povišanega sproščanja inzulina vpliva na boljše pridobivanje na telesni teži, vpliva na boljše mineralizacijo kosti, izboljšanje izida vedenjskih in motoričnih testiranj ter na skrajšanje bivanja v bolnišnici (2, 4–9). TS pozitivno vpliva tudi na spanje; nedonošeni otroci so po TS preko dneva več budni, obdobja neprekinjenih epizod spanja pa so daljša, kar pomembno prispeva k zorenju osrednjega živčevja pri otroku (10–12).

Znano je, da je za normalno ontogenezo možganske skorje potrebna uglašena dotoka informacij iz okolja (13). Med 24. in 28. tednom gestacije in skozi prva tri leta življenja poteka faza hitre sinaptogeneze, ki je občutljiva in kritična doba, v kateri imajo dejavniki okolja sooblikovalni ali pa škodljiv vpliv na razvoj možganske skorje. Na specifični točki razvoja postane za določeni senzorični sistem nujna eksogena stimulacija (14). Okolje vpliva na razvoj plodovih možganov preko vidnih, slušnih, taktilnih, somatostatičnih, kinestetičnih, vonjalnih in okušalnih občutkov (15). V kolikor je dotok običajnih in predvidenih senzoričnih informacij iz okolja prekinjen, pride do pretirane aktivacije že funkcionalnih kortiko-kortikalnih povezav ter do aktivne inhibicije tistih, ki se šele razvijajo. Prezgodnja aktivacija nekaterih kortikalnih poti na ta način inhibira kasnejšo diferenciacijo in vpliva na razvoj povezav predvsem v prefrontalnih delih možganske skorje, ki so vključeni v kompleksne miselne procese (16, 17). Čeprav je somatosenzorna pot pri donošenem novorojenčku zadostno razvita, da oskrbuje možgane s taktilnimi informacijami, pa kortikalne nevrnske povezave, ki procesirajo informa-

cije, ne delujejo na enak način kot pri odraslem človeku (18).

Če želimo opredeliti delovanje določene senzoričnega dražljaja, je nujno poznavanje vedenjske organizacije pri otroku. Kadar govorimo o vedenjski organizaciji novorojenčka, mislimo na uglašenos delovanja fiziološkega in vedenjskega sistema. Vedenjski sistem v grobem opredeljujejo motorične funkcije in stanja čuječnosti. Pri organiziranem vedenju so gibi gladki, povezani v zaporedje in usmerjeni k cilju. Ne opazimo sprememb mišičnega tonusa v ohlapnost. Otrok gladko prehaja med stanji budnosti in spanja, stanje vznemirjenosti ne traja dolgo. Sposoben je uporabljati samopomirjevalna vedenja, kot so sesanje prsta, prinašanje roke na obraz in sprememba položaja. Ob vznemirjenosti se je sposoben pustiti potolažiti s strani zunanjega vira, sposoben je tudi habituacije na ponavljajoče se dražljaje (19).

Pretirana jakost senzoričnega dražljaja ali dražljaj, ki ga novorojenček ne zmore kontrolirati, se odraža s spremembo njegovega vedenja in spremembo nekaterih fizioloških parametrov (20, 21). Škodljiva je predvsem glede na intenziteto in način atipična ter časovno napačno umeščena stimulacija. Časovno pre zgodnje ali preveč intenzivno izpostavljanje dražljajem, ki so v razvoju potrebni kasneje, negativno vpliva na trenutno aktivno razvijajoči se senzorični sistem (14).

Zlasti v najzgodnejšem življenjskem obdobju lahko način in ritem nege dojenčka, interakcija staršev z otrokom in drugi zgodnji socialni vplivi iz okolja pripomorejo tudi k spremembi ritma telesne aktivnosti. Pojav in zorenje stabilnega cirkadianega ritma telesne aktivnosti sta tako odvisna od številnih dejavnikov, glavno vlogo pri njegovi modulaciji pa ima prav zorenje osrednjega živčevja (22). Vzorec telesne aktivnosti novorojenčka sestavlja več krajših obdobjev telesne aktivnosti, ki se izmenjujejo z obdobji mirovanja v vzorcu t. i. ultradianega ritma s periodo, krajšo od 24 ur. Strnjena obdobja telesne aktivnosti s prevladujočo telesno aktivnostjo podnevi in mirovanjem oz. počitkom pretežno v nočnem času lahko pri dojenčku opazimo šele 1–2 meseca po rojstvu (23). Ritem telesne aktivnosti novorojenčka dobro odraža njegov ritem budnosti in spanja, saj dojenček takoj po

rojstvu prične prilagajati svoje spanje cirkadianemu ritmu telesne aktivnosti (22).

V sodobnih oddelkih neonatalne intenzivne nege se uporabljajo različni podporni postopki, s katerimi se zmanjšuje tiste vplive iz okolja, ki neugodno vplivajo na otrokov razvoj. Ti postopki so znani pod imenom celostna individualizirana razvojna oskrba novorojenčkov (angl. *developmental care*) in so zastavljeni tako, da zmanjšujejo neskladje med potrebami nezrelih možganov med kritično dobo razvoja in dejansko izkušnjo prejetih dražljajev iz okolja (24, 25).

## NAMEN

Opredeliti smo želeli vpliv taktilne stimulacije na fiziološke parametre (frekvenca srca, nasičenost hemoglobina s kisikom, arterijski pritisk, telesna temperatura), vedenjske parametre (frekvenca pojavnosti stresnih in samoregulacijskih vedenj) ter na dnevni ritem indeksa telesne aktivnosti v heterogeni skupini donošenih otrok, zdravljenih v enoti neonatalne intenzivne nege.

## METODE

### Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 22 novorojenčkov, 15 dečkov in 7 deklic. Povprečna starost ob vključitvi v raziskavo je bila 20,09 dni (SD = 9,68, min = 9 dni, max = 47 dni), njihova povprečna gestacijska korigirana starost je bila 37,82 tedna (SD = 2,03, min = 34, max = 41 tednov), povprečna porodna teža je znašala 3339,5 gramov (SD = 733,01 g, min = 1170 g, max = 4580 g). Otroci so bili zdravljeni na Neonatalnem oddelku Pediatrične klinike v Ljubljani med 24. 9. 2007 in 30. 5. 2008. Vključili smo otroke, katerih starši so podpisali pisno privolitvev o sodelovanju v raziskavi. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko.

Iz našega vzorca smo izključili otroke s postmenstrualno starostjo manj kot 37 tednov, tiste z jasnimi telesnimi malformacijami ter otroke z akutno bolezensko prizadetostjo: kardiocirkulatornim in/ali respiratornim popuščanjem, s povišano telesno temperaturo, bolečinami, znaki akutnega vnetega



dogajanja ali hudo stopnjo nevroloških znakov po kriterijih Amiel-Tison (26, 27).

## Metode dela

Raziskavo smo zasnovali kot primerjavo vrednosti opazovanih spremenljivk pred postopkom TS in po njem (28).

Somatski status smo opredelili kot optimalen ali neoptimalen ter ga opisno označili z diagnozami. Nevrološki status smo opredelili po metodi Amiel-Tison in otroke razvrstili v skupine glede na izraženo stopnjo nevroloških znakov. Po opredelitvi somatskega in nevrološkega stanja kandidatov za raziskavo smo preverili ustrežanje kriterijem ter pridobili pisno soglasje staršev.

Potek raziskave je moč razdeliti na tri tridnevna obdobja. V prvem obdobju je potekala samo aktrimetrsko meritev otrokovega gibanja, v drugem obdobju je poleg tega potekala TS skupaj z meritvami fizioloških parametrov ter oceno novorojenčkovega vedenja, v zadnjem tridnevem obdobju pa je zopet potekala samo aktimetrija. V obdobju stimulacij so otroci prejeli 15-minutne TS v treh zaporednih dneh, stimulacije je po standardnem postopku izvajala fizioterapevtka (28).

## Fiziološki parametri

Na prvi in tretji dan TS smo minimalno pol ure pred postopkom TS pričeli s snemanjem zapisa kardiorespirografije (CMCRF), s čimer smo nadaljevali še pol ure po postopku TS. Deset minut pred TS ter deset minut po njem smo izmerili arterijski pritisk ter telesno temperaturo.

## Vedenje

Prvi in tretji dan TS smo ocenili novorojenčkovo vedenje deset minut pred izvedbo TS ter deset minut po njej. Uporabili smo Shemo za opazovanje novorojenčkovega vedenja (angl. *Naturalistic Observation of Newborn Behavior Sheet*), avtorice H. Als (4). Shema je bila prevedena in prilagojena v diplomskem delu Grčarjeve (29). Shema je sestavljena tako, da pri vsakem vedenju označimo, če se je neko vedenje v določenem opazovalnem intervalu pojavilo. Iz tega dobimo frekvence pojavnosti posameznih vedenj. V nadaljnjo obravnavo smo vključili tista vedenja, ki so se pojavila

pri več kot 25 % otrok (30). Vedenja je mogoče razvrstiti v dve skupini: skupino stresnih in samoregulacijskih vedenj, s tem pa je moč oblikovati oceno o tem, kako se novorojenček odziva na rokovanje oz. okolje: pretežno stresno – izogibalno ali pa samoregulativno – prilježalno (4).

## Ritem telesne aktivnosti

Tri dni pred pričetkom TS smo pričeli aktimetrsko beležiti gibanje novorojenčkov in ga beležili devet dni, skozi vsa tri tridnevna obdobja. Meritve smo izvajali z aktimetrom Actiwatch (*Cambridge Neurotechnology*). Aktimeter smo dojenčkom namestili nad desni gleženj in ga odstranili samo med nego. Za verodostojno zajemanje otroku lastnega gibanja smo starše in negovalno osebje opozorili, naj s stiskom na gumb za beleženje dogodkov zabeležijo obdobja gibanja, ki je bilo otroku vneseno od zunaj (pestovanje, nega ipd.). Obenem so te dogodke zabeležili tudi na posebej priloženi obrazec.

Pri aktimetriji smo izbrali merilni interval ene minute, v katerem je aktimeter beležil število in jakost telesnih gibov v obliki indeksa telesne aktivnosti. Podatke smo analizirali ločeno za nočni in dnevni čas.

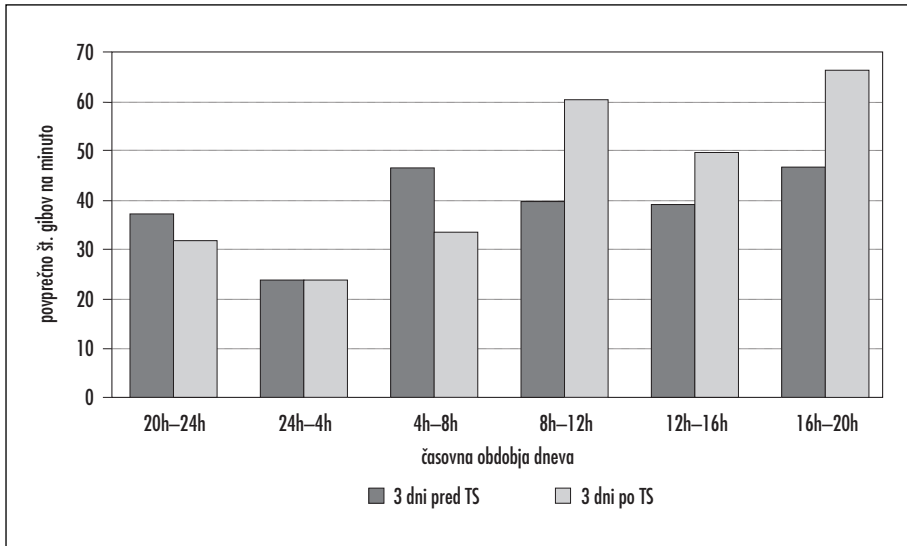
## REZULTATI

### Fiziološki parametri

Razlika med maksimalnimi frekvencami pred TS in po njej prvega dne je bila statistično značilna ( $p = 0,016$ ). Maksimalna frekvenca se je po TS povečala, prav tako pa je prišlo do statistično pomembnega povečanja povprečne frekvence srca pred TS ( $fr = 147,13/min$ ) in po njej ( $fr = 189,26/min$ ) na tretji dan ( $p = 0,012$ ). Do drugih pomembnih sprememb v frekvenci srca ni prišlo. Z uporabo Wilcoxonovega testa predznačnih rangov dveh neodvisnih vzorcev nismo našli statistično značilnih razlik med minimalno, maksimalno in povprečno nasičenostjo hemoglobina s kisikom, v sistolnih in diastolnih pritiskih ter telesni temperaturi pred TS in po njej na prvi in tretji dan.

### Vedenje

Z uporabo Wilcoxonovega testa predznačnih rangov dveh neodvisnih vzorcev smo ugotovo-



Slika 1. Indeks telesne aktivnosti za obdobje treh dni pred taktilno stimulacijo (TS) in treh dni po TS.

čili, da obstaja statistično značilen porast samoregulacijskih vedenj po TS tako prvi ( $p = 0,018$ ) kot tretji dan ( $p = 0,016$ ). Prav tako je prišlo do statistično pomembnega povečanja zastopanosti stresnih vedenj na tretji dan ( $p = 0,030$ ). Izhodiščna frekvenca stresnih vedenj pred TS se je zmanjšala s prvega na tretji dan, vendar ob visoki stopnji SD razlika ni statistično značilna ( $p = 0,062$ ).

### Ritem telesne aktivnosti

Z uporabo Wilcoxonovega testa predznačnih rangov dveh soodvisnih vzorcev smo ugotovili, da je bila razlika med indeksom telesne aktivnosti (št. gibov/min) v tridnevnem obdobju pred stimulacijami v primerjavi z indeksom telesne aktivnosti v tridnevnem obdobju po TS v vseh časovnih obdobjih dneva statistično značilna. Vrednosti ponoči (20h–8h) so po TS značilno nižje, podnevi (8h–20h) pa značilno višje ( $p < 0,01$ ) (slika 1).

### RAZPRAVLJANJE

Ob uvajanju podpornih postopkov v sklopu obravnave bolnih novorojenčkov se nam je zdelo smiselno preveriti učinke TS, saj neposredna aplikacija ugotovitev iz nekaterih predhodnih raziskav ni mogoča zaradi speci-

fičnosti raziskovanih vzorčnih skupin, ki ne omogočajo posplošitve rezultatov na heterogeno populacijo novorojenčkov v enoti intenzivne nege. Ob tem je tudi malo razpoložljivih znanstvenih dokazov o vplivu TS oz. izvira jo večinoma iz ene same raziskovalne ekipe (*Touch Research Institute* na Medicinski fakulteti Miami, ZDA).

Smiselno pa je tudi preverjanje rezultatov v različnih kulturnih okoljih, saj je znano, da imajo matere v vzhodnih družbah tesnejši fizični stik z otroki, to pa je lahko povezano z drugačnim vedenjskim in fiziološkim odzivom otrok na dotik (29).

Novorojenčkove odzive na dotik je treba vedno ocenjevati v kontekstu stanja budnosti oz. čuječnosti, v katerem se otrok trenutno nahaja (31). Speči novorojenček na taktilne dražljaje odgovori s prehodnim porastom telesne aktivnosti ter frekvenca srca (32, 33). Če je dražljaj vnesen po hranjenju, je porast frekvenca srca manjši, kot če je vnesen pred hranjenjem. V budnem stanju otrok pred hranjenjem na dražljaj odgovori z znižanjem frekvenca srca, medtem ko po hranjenju na isti dražljaj odgovori z zvišanjem frekvenca srca (33). Kadar je dojenček v aktivnih stanjih čuječnosti navadno odgovori na taktilni dražljaj z upadom telesne aktivnosti (32). V naši raziskavi smo vpliv hranjenja izključili s tem,

da smo pri vseh otrocih izvajali TS uro in pol po zadnjem hranjenju. Predvidevali smo, da bodo začetne meritve arterijskega pritiska in telesne temperature otroke prebudile, a se to pri vseh otrocih ni zgodilo. Vpliva spremenljivega stanja budnosti na odzive novorojenčkov na našem nivoju analize ni mogoče interpretirati.

Standardizacija razmer ob izvajanju TS je bila v danem okolju, ki v prvi vrsti ni namenjeno raziskovalnemu delu, težavna in včasih nemogoča. Med izvajanjem TS je bil tako pri nekaterih preiskovancih prisoten hrup (uvajanje terapije, opravljanje preiskav in nege, jok drugih otrok, pomirjujoča tiha glasba). Vpliva hrupa na vedenje in spremembe fizioloških parametrov tako ne moremo z gotovostjo izključiti. Vemo namreč, da tudi pri dobro vedenjsko in fiziološko organiziranem novorojenčku hrup povzroči določen stres (19, 31).

Analiza sprememb fizioloških parametrov je pokazala, da TS ne povzroči nestabilnosti v parametrih, ki smo jih spremljali: arterijski pritisk, nasičenost hemoglobina s kisikom, frekvenca srca, telesna temperatura. V naši raziskavi smo izgube telesne toplote nadzirali s tem, da je bil otrok med stimulacijami nameščen pod grelec. Menimo, da je uporaba grelca smiselna in koristna, saj sicer v literaturi zasledimo, da TS lahko prispeva k izgubi telesne toplote (34).

Pri analizi sprememb frekvence srca so se pokazale posamezne tendence v spreminjanju maksimalnih in povprečnih frekvenc srca, vendar se je po podrobnejši analizi izkazalo, da je frekvenca srca večinoma nihala pri otrocih, ki so imeli nevrološki status opredeljen kot neoptimalen in so obenem v zdravljenju prejemali fenobarbiton. Pred uvedbo TS v tej skupini otrok bi bilo treba natančneje preučiti njihovo zmožnost samoregulacije frekvence srca ob TS. V primeru, da bi otroci tovrstne samoregulacije ne zmogli, bi tej skupini otrok, do izboljšanja nevrološkega statusa, TS odsvetovali.

Pri analizi vedenja novorojenčka pred TS in po njej, smo se osredotočili na spremembo deleža stresnih in samoregulacijskih vedenj in ne na nivo zastopanosti posameznih vedenj. Taktilna stimulacija ima po nekaterih raziskavah splošno pomirjujoč vpliv na dojenčke, ugotavljajo tudi zmanjšanje stresnih vedenj

po enkratni TS (4, 29). Zastopanost stresnih vedenj se, v nasprotju z našimi pričakovanji, na prvi dan TS po postopku stimulacije glede na izhodiščno stanje ni spremenila. Bazalni nivo stresnih vedenj pa je bil na tretji dan TS nižji kot prvi dan, vendar ob veliki SD razlika ni bila statistično značilna. Porast samoregulacijskih vedenj je bil pričakovan in konstanten ter statistično značilen (prvi dan:  $p = 0,018$ , tretji dan:  $p = 0,016$ ). V vseh primerih je nivo samoregulacijskih vedenj presegal nivo stresnih, kar je skladno z izsledki zastopanosti teh vedenj ob negi novorojenčka (29).

Metoda aktimetrije, ki smo jo uporabili za spremljanje novorojenčkovega gibanja nam preko vzorcev časovnega pojavljanja telesnega gibanja omogoča posredno sklepanje o stanju preiskovančeve čuječnosti in s tem o arhitekturi njegovega spanja (35). Naši izsledki kažejo, da je v obdobju po izvajanju TS povprečni indeks telesne aktivnosti v vseh dnevnih časovnih intervalih značilno višji, v vseh nočnih časovnih intervalih pa značilno nižji kot v obdobju pred TS. Vrh telesne aktivnosti je bil v dneh pred TS med 4. in 8. uro zjutraj, v dneh po TS pa med 16. in 20. uro popoldne. Tako lahko sklepamo, da TS ugodno vpliva na razvoj cirkadianega ritma telesne aktivnosti novorojenčka. Zmanjšanje telesne aktivnosti preko noči je pozitivno tudi v smislu zmanjševanja izčrpanosti matere, ki je ob neprilagojenem ritmu čuječnosti novorojenčka sicer prikrajšana za kakovosten spanec (36). Večja telesna aktivnost podnevi pa odraža večjo stopnjo dojenčkove čuječnosti, kar je osnova za začetek zanimanja za okolico ter s tem za prejetje senzoričnih dražljajev, ki pomembno vplivajo na razvoj novorojenčkovih možganov (14, 15). Budnost preko dneva je pomembna tudi za navezavo odnosov in vezi med otrokom in skrbniki (10).

Naši rezultati v veliki meri potrjujejo pravilo, ki velja na bolnišničnih oddelkih za novorojenčke; rokovanje z otrokom in dotik naj bosta prilagojena, nežna in sinhrona z otrokovimi ritmi telesne aktivnosti. Posebej pri otrocih z neoptimalnim nevrološkim statusom je med posameznimi postopki TS potreben nadzor avtonomnih in vedenjskih odgovorov, kar pomeni, da je vse postopke z otrokom treba načrtovati individualno. Kljub dejstvu, da je TS v skupinah stabilnih,

došenih otrok varna metoda, pa večina raziskovalcev svari pred uporabo pri zdravstveno nestabilnih otrocih, otrocih, ki potrebujejo podporo dihanja, ter pri tistih, ki izkazujejo stresno vedenje, ki je posledica operacije ali drugega bolečega postopka (37).

## ZAKLJUČEK

Zaključimo lahko, da je TS varen postopek, ki pa mora biti individualno načrtovan. TS vpliva na vedenjske vzorce ter vzpostavitev cirkadianega ritma telesne aktivnosti novorojenčkov v enoti intenzivne nege, zato se nam zdi smiselno, da se TS vključi v klinič-

no prakso kot podporni postopek v konceptu celostne individualizirane razvojne oskrbe novorojenčkov.

## ZAHVALE

Zahvala gre asist. dr. Barbari Gnidovec Stražičar, dr. med., za delo pri analizi aktimetrskih zapisov, medicinskim sestram Neonatalnega oddelka za trud in dodatno delo, fizioterapevtki Saši Berič za izvedbo stimulacij, vsem malim preiskovancem in njihovim staršem za potrpežljivost in izkazano zaupanje ter kolegu študentu medicine Marku Reberniku za pomoč pri meritvah in pridobivanju podatkov.

## LITERATURA

1. Field TM. Stimulation of preterm infants. *Pediatr Rev.* 2003; 24 (1): 4–11.
2. Beider S, Moyer CA. Randomized Controlled Trials of Pediatric Massage: A Review. *eCAM* 2006; 1–12.
3. Mainous RO. Infant Massage as a Component of Developmental Care: Past, Present and Future. *Holist Nurs Pract.* 2002; 17 (1): 1–7.
4. Spielberger CD. Conceptual and methodological issues in anxiety research. In: Spielberger CD, ed. *Anxiety: Current trends in Theory and Research*. Vol. 2. New York: Academic Press; 1972. p. 481–93.
5. Field T, Henteleff T, Hernandez-Reif M, et al. Children with asthma have improved pulmonary function after massage therapy. *J Pediatr.* 1998; 132: 854–8.
6. Hernandez-Reif M, Field T, Krasnegor J, et al. Children with cystic fibrosis benefit from massage therapy. *J Pediatr Psychol.* 1999; 24 (2): 175–81.
7. Field T. Massage therapy facilitates weight gain in preterm infants. *Current Directions in Psychological Science.* 2001; 10: 51–4.
8. Hernandez-Reif M, Field T, Diego M, et al. Evidence-based medicine and massage. *Pediatrics.* 2001; 108 (4): 1053.
9. Hernandez-Reif M, Ironson G, Field T, et al. Children with Down syndrome improved in motor function and muscle tone following massage therapy. *Journal of Early Intervention.* 2006; 176: 395–410.
10. Dieter JN, Field T, Hernandez-Reif M, et al. Stable preterm infants gain more weight and sleep less after five days of massage therapy. *J Pediatr Psychol.* 2003; 28 (6): 403–11.
11. Caulfield R. Beneficial effects of tactile stimulation on early development. *Early Childhood Education Journal.* 2000; 27 (4): 255–7.
12. Ludington-Hoe S, Johnson MW, Morgan K, et al. Neurophysiologic assesment of neonatal sleep organisation: Preliminary results of a randomized, controlled trial of skin contact with preterm infants. *Pediatrics.* 2006; 117 (5): 909–21.
13. Mower GD, Christen WG. Animal models of strabismic amblyopia: physiological studies of visual cortex and lateral geniculate nucleus. *Dev Brain Res.* 1982; 5: 311–27.
14. Liu WF, Laudert S, Perkins B, et al. The development of potentially better practices to support the neurodevelopment of infants in the NICU. *J Perinatol.* 2007; 27: 48–74.
15. Als H. Neurobehavioural development of the preterm infant. In: Fanaroff AA, Martin RJ, eds. *Neonatal-Perinatal medicine: Diseases of the fetus and infant*. St. Louis: Mosby; 1999. p. 964–90.
16. Linn Pl, Horowitz FD, Fox HA. Stimulation in the NICU: is more necessarily better? *Clin Perinatol.* 1985; 12: 407–22.
17. Duffy FH, Als H, McAnulty GB. Behavioral and electrophysiological evidence for gestational age effects in healthy preterm and fullterm infants studied 2 weeks after expected date. *Child Dev.* 1990; 61: 1271–86.
18. Lauronen L, Nevalainen P, Wikström H, et al. Immaturity of somatosensory cortical processing in human newborns. *NeuroImage.* 2006; 33: 195–203.
19. D'Apolito K. What is an organised infant? *Neonatal Netw.* 2001; 10 (1): 23–9.

20. Lester BM, Tronick EZ. History and description of the neonatal intensive care unit network neurobehavioral scale. *Pediatrics*. 2004; 113 (3): 634-40.
21. Brazelton TB, Lester BM, Tronick EZ. The neonatal intensive care unit network neurobehavioral scale procedures. *Pediatrics*. 2004; 113 (3): 641-67.
22. Mirmiran M, Maas YGH, Ariagno L. Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms. *Sleep Med Rev*. 2002; 7: 321-34.
23. Rivkees SA. Developing circadian rhythmicity in infants. *Pediatrics*. 2003; 112: 377-81.
24. Laudert S, Liu WF, Blackington S, et al. Implementing potentially better practices to support the neurodevelopment of infants in the NICU. *J Perinatol*. 2007; 27: 57-93.
25. Als H, Duffy F, McAnulty GB, et al. Early experience alters brain function and structure. *Pediatrics*. 2004; 113 (4): 846-57.
26. Amiel-Tison C. Update of the Amiel-Tison neurologic assessment for the term neonate or at 40 weeks corrected age. *Pediatr Neurol*. 2002; 27: 196-212.
27. Paro Panjan D. Nevrološki pregled novorojenčka po Amiel-Tisonovi: Klinična uporabnost, primerjava z drugimi metodami in prognostični pomen za nevrološko-razvojni izid ob letu [doktorsko delo]. Ljubljana (SVN): Univerza v Ljubljani; 2005.
28. Lindrea KB, Stainton MC. A case study of infant massage outcomes. *American Journal of Maternal/Child Nursing*; 25 (2): 95-9.
29. Grčar M. Shema za opazovanje novorojenčkovega vedenja: Vedenje novorojenčka pred, med in po negi na enoti intenzivne nege [diplomsko delo]. Ljubljana (SVN): Univerza v Ljubljani; 2006.
30. Holsti L, Grunau ER, Oberlander FT, et al. Specific newborn individualised developmental care and assessment program movements are associated with acute pain in preterm infants in the Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatrics*. 2004; 114 (1): 65-72.
31. Brazelton TB. Behavioral competence. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG, eds. *Neonatology, pathophysiology and management of the newborn*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999. p. 321-32.
32. Wolff P. Observations on newborn infants. *Psychosom Med*. 1959; 21 (2): 110-8.
33. Pomerleau-Malcuit A, Clifton KR. Neonatal heart rate response to tactile, auditory and vestibular stimulation in different states. *Child Dev*. 1973; 44: 485-96.
34. Lovic V, Fleming AS, Fletcher PJ. Early life tactile stimulation changes adult rat responsiveness to amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 84: 497-503.
35. Gnidovec Stražičar B. Melatonin in ritem budnosti in spanja pri dojenčkih z navidezno življenje ogrožajočim dogodkom [doktorsko delo]. Ljubljana (SVN): Univerza v Ljubljani; 2007.
36. Goldstein Ferber S, Laudon M, Kuint J, et al. Massage therapy by mothers enhances the adjustment of circadian rhythms to the nocturnal period in full-term infants. *J Dev Beh Pediatr*. 2002; 23 (6): 410-5.
37. Browne JV. Developmental Care – Considerations for Touch and Massage in the Neonatal Intensive Care Unit. *Neonatal Network*. 2000; 19 (1): 61-4.

Prispelo 8.3.2009

Vojko Berce<sup>1</sup>, Ivan Krajnc<sup>2</sup>, Uroš Potočnik<sup>3</sup>

# Biološka zdravila pri zdravljenju astme

## *Biologic Drugs in Asthma Treatment*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** monoklonalna protitelesa, proinnetni citokini, anti IgE, omalizumab

Razvoj novih protiastmaticnih zdravil je usmerjen predvsem v sintezo zaviralcev proinnetnih citokinov in protiteles IgE. V ta namen tudi pri astmi preizkušajo nekatera biološka zdravila, najpogosteje gre za monoklonalna protitelesa ali spremenjene receptorje. Poizkusi potekajo še s protivnetnimi citokini, inhibitorji kemokinov, inhibitorji kinaz, protilimfocitnimi protitelesi, blokatorji celične adhezije in CpG oligonukleotidi. Največ obetajo zdravila, usmerjena proti interleukinom IL-4, IL-5, IL-13, citokinu TNF $\alpha$  in IgE protitelesom. Humanizirano monoklonalno protitelo proti vezavnemu mestu imunoglobulina E je edino biološko zdravilo, ki se že uporablja za zdravljenje astme. Boljše razumevanje molekularnih mehanizmov astme vodi v odkrivanje novih terapevtskih tarč.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** monoclonal antibodies, proinflammatory cytokines, anti IgE, omalizumab

Development of the new antiasthmatic drugs is directed above all in the synthesis of the inhibitors of the proinflammatory cytokines and IgE antibodies. Several biologic drugs are tested for this purpose; most common of them are monoclonal antibodies or modified receptors. Experiments were also done with antiinflammatory cytokines, chemokine inhibitors, antilymphocytic antibodies, cell adhesion blockers and CpG oligonucleotides. The most promising drugs are those directed against interleukines IL-4, IL-5, IL-13, cytokine TNF $\alpha$  and IgE immunoglobulin. Humanized monoclonal antibody directed against immunoglobulin E binding site is the only biologic drug which is already used in the asthma treatment. Better understanding of the molecular mechanisms of asthma leads to the identification of the new therapeutic targets.

---

<sup>1</sup> Vojko Berce, dr. med., Oddelek za pediatrijo, Splošna bolnišnica Murska Sobota, Ulica prim. Vrbnjaka 6, Rakičan, 9000 Murska Sobota; vojko.berce@guest.arnes.si

<sup>2</sup> Prof. dr. Ivan Krajnc, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

<sup>3</sup> Doc. dr. Uroš Potočnik, univ. dipl. kem., Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

## UVOD

O bioloških zdravilih govorimo, ko v preventivne ali terapevtske namene uporabljamo substance, ki so narejene iz živega organizma ali jih le-ta sintetizira. Med biološka zdravila v ožjem pomenu tako štejemo naravna ali spremenjena protitelesa, citokine, hormone, receptorje in cepiva iz živih, oslabljenih ali mrtvih organizmov oz. njihovih delov. Pojem bioloških zdravil pa ponavadi obsega še rekombinantno proizvedene proteine, nukleinske kisline in gensko terapijo (1).

Pri zdravljenju astme najpogosteje uporabljamo inhalacijske glukokortikoide in protilevkotrienska zdravila. Ta terapija je pri astmi zelo učinkovita in ima malo stranskih učinkov. Vsaj 25 % astmatikov pa kljub ustrezni terapiji ne doseže optimalnega nadzora nad boleznijo. Predvsem pri otrocih se tudi pogosto sprašujemo o neželenih učinkih uveljavljene terapije. Zdravila, ki bi ozdravilo astmo, pa zaenkrat ne poznamo. Zato tudi pri astmi obstaja dovolj razlogov za iskanje učinkovitejših in varnejših zdravil. Velik del teh iskanj je usmerjen v področje bioloških zdravil. Razvoj novih protiastmaticnih zdravil pa je otežen, ker živalski modeli astme le deloma odražajo terapevtski učinek pri ljudeh (2).

Sinteza novih protiastmaticnih zdravil je bila v zadnjih letih usmerjena predvsem

proti tarčam, ki jih predvideva razumevanje imunopatogeneze astme kot bolezni imunskega odziva posredovanega s Th limfociti tipa 2 (Th2 celice). Imunski odziv tipa Th2 pri alergičnem vnetju in astmi prikazuje slika 1.

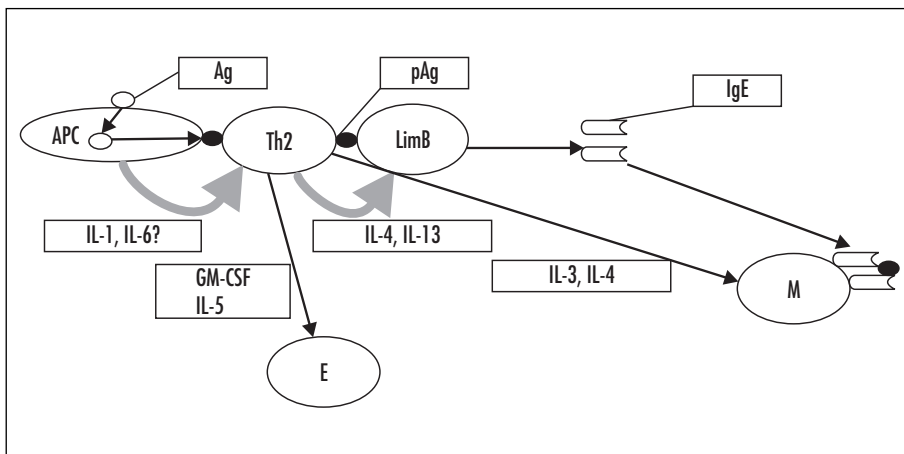
Imunski odziv Th2 je posredno odgovoren za mnoge morfološke in funkcionalne značilnosti astme. Zato so strategije razvoja protiastmaticnih zdravil pogosto usmerjene proti limfocitu Th2 oziroma citokinom, ki jih limfociti Th2 izločajo. Privlačno tarčo za nova zdravila predstavljajo tudi sekundarni učinki delovanja limfocitov Th2, kot so npr. izločanje specifičnih IgE, aktivacija mastocitov ali migracija eozinofilcev (3).

## ANTAGONISTI PROVNETNIH CITOKINOV

### Interlevkin 5 (IL-5)

IL-5 ima ključno vlogo pri astmatskem in alergičnem vnetju. Pri IL-5 »knockout«  
miši, ki ji manjka funkcionalen gen za IL-5, je močno zmanjšan eozinofilni odgovor na alergen in odzivnost dihal po vnosu alergena v organizem. Tudi monoklonalna protitelesa proti IL-5 pri primatih dosežejo opisan učinek, ki traja 3 mesece. Zdravilo mepulizumab se daje intravensko, poizkusi so bili opravljeni tudi pri ljudeh. Žal v teh študijah niso ugotavljali

12



Slika 1. Imunski odziv atopika. APC – antigen predstavljena celica, Th – celica pomagalka, LimB – limfocit B oz. plazmatka, E – eozinofil, M – mastocit, IL-1 – interlevkin 1, IL-3 – interlevkin 3, IL-4 – interlevkin 4, IL-5 – interlevkin 5, Ag – antigen, pAg – procesiran antigen, Ig – imunoglobulini.

učinka mepulizumaba na odzivnost dihal po stiku z alergenom. Pri bolnikih s hudo in na steroide odporno astmo protitelesa proti IL-5 nimajo pomembnega učinka na pljučno funkcijo, čeprav zmanjšajo število eozinofilcev v krvi. Rezultati postavljajo pod vprašaj vlogo eozinofilcev pri astmi in razvoj potencialnih zdravil usmerjenih proti njim. Verjetno pa je tudi učinek zdravila mepulizumab na tkivne eozinofilce manjši kot na tiste v krvi (4–6).

### **Interlevkin 4 (IL-4)**

IL-4 ima ključno vlogo pri preklopu sinteze imunoglobulinov, ki jih sintetizirajo limfociti B, v razred IgE. IL-4 sodeluje tudi pri usmerjanju razvoja Th celic v smer Th2 na samem začetku nastajanja alergijskega imunskega odziva. Zato predstavlja IL-4 potencialno pomembno tarčo v razvoju protiastmaticnih zdravil. V poizkusni terapiji pri ljudeh so že uporabljali tako monoklonalna protitelesa proti IL-4 kot tudi humaniziran receptor za IL-4. Slednjega so preizkušali tudi v obliki inhalacij. Doslej opravljene klinične študije se zaenkrat niso izkazale kot uspešne, vendar pa študije z receptorjem za IL-4 v heterodimerni obliki še potekajo. Prav tako še potekajo študije z mutirano obliko IL-4, ki se veže na skupno podenoto receptorjev za IL-4 kot tudi za IL-13 in ju blokira (7, 8). Tudi razvoj teh zdravil je še v poskusni fazi. Podobno velja za inhibitorje STAT-6, ključnega proteina signalne transdukcije receptorjev za IL-13 in IL-4 (9).

### **Interlevkin 13 (IL-13)**

IL-13 spodbuja izločanje mukusa, imunoglobulinov razreda E in tudi odzivnost dihal. Kljub neokrnjenemu eozinofilnemu odgovoru se pri IL-13 »knockout«*» miši močno zmanjša odzivnost dihal po stiku z alergenom, kar posredno dokazuje, da eozinofilno vnetje ni (edini) vzrok preodzivnosti dihal. Večina proastmatically učinkov IL-13 poteka preko receptorske podenote IL-4R $\alpha$ , ki je skupna tudi receptorju za IL-4, in nato postreceptorsko v zaporedju prenašanja signala preko proteina STAT-6. Receptor IL-13R $\alpha$ 2 pa ne posreduje provnetnih lastnosti IL-13, temveč služi kot lažna tarča. Topni receptor IL-13R $\alpha$ 2 močno veže IL-13 in učinkovito blokira nje-*

*govo proastmatically delovanje. Topni receptor IL-13R $\alpha$ 2 je v mišjem modelu bolj učinkovit kot protitelesa proti IL-4 ali IL-13. Tudi humaniziran IL-13R $\alpha$ 2 receptor in monoklonalna protitelesa proti IL-13 so trenutno v fazi kliničnega preizkušanja na ljudeh (10, 11).*

### **Interlevkin 1 (IL-1)**

IL-1 poveča izražanje številnih genov za provnetne citokine, ki sodelujejo pri astmatically vnetju, poizkusi s humanim rekombinantnim antagonistom IL-1 receptorja (anakira) pa niso bili uspešni (12).

### **TNF $\alpha$ (Faktor tumorske nekroze alfa)**

TNF $\alpha$  deluje provnetno preko aktivacije številnih transkripcijskih dejavnikov, kot sta npr. jedrni faktor kapa B in aktivatorski protein-1. Odgovoren je za privabljanje nevtrofilcev in tudi eozinofilcev v področje vnetja preko vpliva na adhezijske molekule. TNF $\alpha$  v dihalih izločajo predvsem mastociti. TNF $\alpha$  ima pomembno vlogo pri nekaterih kroničnih vnetnih boleznih, kot so npr. revmatoidni artritis, spondiloartropatije, Chronova bolezen, kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB) in psoriza. V nastanek teh bolezni je za razliko od astme vpleten imunski odziv Th1 z večjo vlogo nevtrofilcev, ki pri astmi praviloma niso pomembni. Kljub temu genetske študije ugotavljajo povezavo med polimorfizmi v genu za TNF $\alpha$  in astmo. Predvsem pri hudi in dolgotrajni astmi ugotavljajo prisotnost drugih citokinov, s prevladovanjem imunskega odziva tipa Th1 in nevtrofilcev. Takih astmatikov je okrog 10 %, glukokortikoidi pa so pri njih bistveno manj učinkoviti. Kljub majhnemu deležu pa gre za pomembno skupino z vidika obolenosti, smrtnosti in tudi stroškov (13). Blokirajoča monoklonalna protitelesa proti TNF $\alpha$  (infliximab) in topni receptor za TNF $\alpha$  (etanercept) že rutinsko uporabljajo pri terapiji revmatoidnega artritisa in kronične vnetne bolezni črevesja (KVČB). Etanercept je rekombinantno izdelan fuzijski protein iz dveh topnih receptorjev za TNF $\alpha$ , vezanih na Fc del protitelesa (9). Pri terapiji astme zdravil proti TNF $\alpha$  še ne uporabljamo v klinični praksi, potekajo pa klinične študije pri ljudeh z astmo. V študiji Howartha in sodelavcev



tako ugotavljajo povečano vrednost TNF $\alpha$  v bronho-alveolarni lavaži in povečano izražanje gena za TNF $\alpha$  samo pri bolnikih s hudo in na steroide vsaj delno neodzivno astmo. Pri teh astmatikih je etanercept izboljšal pljučno funkcijo in zmanjšal odzivnost dihal ter število poslabšanj. Žal je bil terapevtski del študije odprt in nekontroliran. Pomembnejših stranskih učinkov zdravila niso zaznali, pogoste pa so bile reakcije na mestu vnosa zdravila v organizem (13). V dvojno slepi študiji Berrya in sodelavcev ugotavljajo podobno učinkovitost zdravila pri bolnikih s hudo in neodzivno astmo. Etanercept ne vpliva pomembno na označevalce alergijskega vnetja, zato domnevamo, da je učinek zdravila verjetno povezan z delovanjem TNF $\alpha$  na mastocite in gladke mišice. Zdravila proti TNF $\alpha$  niso primerna za zdravljenje blage in zmerne astme (14).

## PROTIVNETNI CITOKINI

V telesu obstajajo številni citokini, ki delujejo zaviralno na celice astmatičnega vnetja in imajo zato terapevtski potencial pri astmi. Poizkusi potekajo predvsem v smeri razvoja zdravil, ki bi vzpodbudila endogeno izločanje teh citokinov in aktivacijo njihovih receptorjev (15).

Interleukin 10 je močan protivnetni citokin, ki zavira sintezo mnogih provnetnih citokinov (TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-5). Inhibira tudi nekatere encime (iNO, COX2), ki sodelujejo v razvoju astmatičnega vnetja. Pri nekaterih astmatikih morda obstaja napaka pri transkripciji gena za IL-10. Zaradi tega bi lahko prišlo do zmanjšane izločanja tega citokina iz mastocitov. Specifična imunoterapija z alergenom poveča izločanje IL-10 v regulatornih Th celicah. Rekombinantni humani IL-10 je učinkovit pri terapiji kroničnih vnetnih črevesnih bolezni in psoriaze. Pri astmi potekajo raziskave v smeri sinteze zdravil, ki ojačajo prenos signala preko IL-10 ali pa povečajo njegovo endogeno nastajanje (9).

Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) inhibira celice Th2 in zmanjša eozinofilno vnetje. Zdravilo pa v obliki inhalacij ni dovolj učinkovito. Specifična imunoterapija poveča tudi izločanje IFN- $\gamma$  v Th1 celicah (16).

Interleukin 12 je endogeni regulator diferenciacije Th celic in vpliva na razmerje

Th1/Th2 v smeri ojačanja Th1 odgovora. Astmatiki imajo nižji nivo IL-12 v krvi. Rekombinantni IL-12 je pri astmatikih zmanjšal kazalce eozinofilnega vnetja (eozinofilijo v krvi in sputumu), ni pa vplival na preodzivnost dihal. Zdravilo je imelo tudi precej toksičnih učinkov. Vnos fuzijskega proteina, sestavljene iz alergena in IL-12, pa izzove ugoden Th1 odgovor na alergen s povečano sintezo specifičnih IgG2 (namesto IgE) protiteles proti alergenu, kar lahko koristi pri specifični imunoterapiji (9, 17).

## INHIBITORJI CITOKINOV

Številni kemokini so vpleteni v privabljanje in aktivacijo vnetnih celic pri astmi. Receptorji za kemokine spadajo v družino transmembranskih receptorjev, ki so združeni z G proteinom, zato je možna sinteza majhnih molekul, ki inhibirajo te receptorje. Pri astmi imajo pomembno vlogo predvsem eotaksini, MCP-3, MCP-4 in RANTES ter receptor CCR3 za te molekule na eozinofilcih, mastocitih in limfocitih Th2 (3, 18). Poleg inhibitorjev CCR3 preizkušajo pri astmatikih tudi uporabo monoklonalnih protiteles proti pomembnejšim kemokinom in uporabo modificiranega RANTES kemokina. Modificiran RANTES kemokin inhibira receptor CCR3 in tudi nekatere druge kemokinske receptorje na T limfocitih.

Kemokin MCP-1 aktivira CCR2 receptorje na limfocitih T in monocitih. Blokada MCP-1 z nevtralizirajočimi protitelesi zmanjša privabljanje vnetnih celic, pri poizkusnih živalih pa tudi preodzivnost dihal (9).

## INHIBITORJI KINAZ

V nastanku alergijskega vnetja imajo pomembno vlogo tudi številne tirozinske kinaze. Vranična tirozinska kinaza (angl. *spleen tyrosine kinase*, syk) je vključena v prenos signala preko visokoafinitetnega IgE receptorja mastocitov ter v prenos signala preko receptorjev za antigen na limfocitih T in B. »Knockout«  
miška, ki nima funkcionalnega gena za syk kinazo, kaže popolno inhibicijo degranulacije mastocitov. Na modelu laboratorijske živali so z uporabo protismiselnega oligonukleotida proti mRNA za syk kinazo v obliki aero-

sola preprečili razvoj alergijskega vnetja po izpostavljenosti alergenu. Ker pa je encim syk kinaza vključen v številne fiziološke procese, se postavlja vprašanje varnosti uporabe njegovih inhibitorjev (19).

## PROTILIMFOCITNA PROTITELESA

V fazi kliničnega preizkušanja pri astmatikih so še himerna protitelesa proti CD4+ antigenu na T celicah (keliximab) izkazala za malo uspešna. Ker keliximab nespecifično inhibira limfocite T, se pri njegovi uporabi pojavlja tudi vprašanje imunosupresije. Zato gredo poizkusi pri antilimfocitnih zdravilih bolj v smer selektivne blokade Th2 celic preko receptorjev za njihovo aktivacijo (20).

## BLOKATORJI CELIČNE ADHEZIJE

Infiltracija vnetnih celic v tkivo poteka preko njihove adhezije na endotelij. Pri tem sodelujejo adhezijske molekule, kot so npr. integrini in selektini na levkocitih ter endotelu. Monoklonalna protitelesa proti adhezijski molekuli ICAM-1, ki se nahaja na endotelij-skih celicah, preprečijo eozinofilno infiltracijo in tudi povečanje odzivnosti dihal po stiku z alergenom pri primatih. Monoklonalno protitelo proti adhezijski molekuli VLA4 (natalizumab) kaže terapevtski učinek pri Chronovi bolezni in je tudi potencialno zdravilo pri astmi (9, 21).

## INHIBITORJI KOSTIMULACIJE

Kostimulatorne molekule na dendritičnih celicah imajo morda ključno vlogo pri diferenciaciji Th celic ob predstavitvi antigena. Kostimulatorna molekula B7 dendritične celice se veže s CD28 molekulo limfocita T. Podtip B7.2 spodbuja Th2 odgovor. Blokirajoča protitelesa proti molekuli B7.2 preprečijo nastanek specifičnih IgE in eozinofilijo pri mišjem modelu astme. Proti-CD28 protitelo pa prepreči proliferacijo T celic po stiku z alergenom. Naštete molekule na limfocitih T in dendritičnih celicah predstavljajo potencialne tarče za razvoj zdravil proti vsem atopijskim obolenjem (9, 22).

## ANTI IgE

Omalizumab, humanizirano monoklonalno protitelo proti vezavnemu mestu imunoglobulina E za visokoafinitetni IgE receptor, je edino biološko zdravilo, ki se tako po svetu kot tudi v Sloveniji že uporablja pri zdravljenju astme v klinični praksi. Imunoglobulini razreda E imajo ključno vlogo predvsem pri alergijski astmi. IgE se vežejo na različne vnetne celice preko visokoafinitetnega (FcεRI) ali nizkoafinitetnega (FcεRII) receptorja. Alergen, ki premosti dve molekuli IgE, vezani na celico, povzroči njeno aktivacijo. Mastociti kot ena ključnih celic alergijske astme po aktivaciji izločajo njim lastne mediatorje in tudi številne interlevkine, značilne za imunski odgovor tipa Th2, kot sta npr. IL-4 in IL-5. Zdravilo omalizumab zniža vrednost IgE v krvi in prepreči sproščanje številnih mediatorjev iz mastocitov, ključnih predvsem v zgodnji fazi odgovora atopika na alergen. Zdravilo zmanjša tudi število in aktivnost IgE receptorjev na mastocitih ter drugih vnetnih celicah. Omalizumab oslabi zgodnji in pozni vnetni odgovor na alergen, zmanjša eozinofilijo v krvi in sputumu, izboljša pljučno funkcijo in nadzor nad astmo. Ob uporabi zdravila omalizumab se zmanjša tudi potreba po glukokortikoidih (23, 24). V študiji Djukanovića in sodelavcev na 45 bolnikih z blago do zmerno perzistentno alergijsko astmo ugotavljajo po 16 tednih zdravljenja z omalizumabom močno zmanjšanje števila eozinofilcev tako v krvi kot tudi v sluznici dihal. Zmanjšala se je tudi infiltracija z limfociti T in limfociti B. Zdravilo pa ni vplivalo na bronhialno preodzivnost za vdihani metaholin, kar je še en dokaz o odsotnosti vzročne povezave med alergičnim vnetjem in preodzivnostjo dihal. Za klinično uporabnost je verjetno ključen vpliv zdravila na eozinofilce, ki so pri astmi pomemben vir levkotrienov in proteinov odgovornih za uničevanje epitelija dihal. Omalizumab deluje na eozinofilce posredno preko negativnega vpliva na sekrecijo IL-4 in IL-5 iz mastocitov. Ravno IL-4 je citokin, na katerega glukokortikoidi bistveno ne vplivajo (23). Nedvomno je pomemben tudi negativen vpliv zdravila na aktivnost receptorjev za IgE. Tako visokoafinitetni kot nizkoafinitetni receptor za IgE se nahajata tudi na dendritičnih celicah

in imata pomembno vlogo pri predstavitvi alergena, kjer prav tako sodeluje IL-4. Ob manjši aktivnosti teh receptorjev poteka proces predstavitve antigena bistveno počasneje. Zdravilo se daje na 2–4 tedne v obliki podkožne injekcije in bistveno izboljša nadzor nad astmo ter zmanjša potrebo po glukokortikoidih. Preden lahko ocenimo odziv na zdravilo, ga mora bolnik prejemati vsaj 12 tednov. Učinek omalizumaba je praviloma večji pri hudi astmi. Zdravilo je odobreno v nekaterih državah, uporablja se lahko tudi pri otrocih. Omalizumab je zaradi visokih stroškov zaenkrat namenjen le bolnikom s hudo astmo, ki je ne moremo nadzorovati z nizkimi dozami oralnih glukokortikoidov (23, 25).

## PREVENTIVNA ZDRAVILA

Ob rojstvu pri ljudeh prevladuje imunski odgovor tipa Th2 na antigene iz okolja. Na kasnejšo vzpostavitev Th1 odgovora vplivajo tudi impulzi iz okolja. Med temi imajo verjetno največjo vlogo okužbe, pa tudi cepljenja. Predvsem BCG cepljenje spodbuja odgovor Th1 in s tem prepreči atopijska obolenja. Aplikacija BCG cepiva 2 tedna pred aplikacijo alergena pri miškah zmanjša tvorbo specifičnih IgE protiteles, poveča pa se tvorba interferona gama. Nekatere študije kažejo, da besežiranjje izboljša tudi nadzor nad astmo (26).

## CpG OLIGONUKLEOTIDI

Oligonukleotidi, ki vsebujejo nemetilirane dinukleotide citozina in gvanina (CpG), so učinkoviti spodbujevalci Th1 celic. Nemetilirana CpG zaporedja se ne nahajajo v celicah sesalcev. Hkratna izpostavljenost alergenu in bakterijski DNA, ki vsebuje takšna zaporedja, ojača Th1 odziv na alergene. Takšen odziv je morda podlaga za epidemiološko potrjeno okoljsko hipotezo razvoja alergij. Klraten vnos antigena in CpG oligonukleotida pa omogoči tudi razvoj tolerance pri že senzibilizirani živali. Študije na živalih kažejo, da vnos CpG oligonukleotidov zmanjša vnetni odgovor na alergen in tudi eozinofilno vnetje. CpG oligonukleotidi zato veliko obetajo pri specifični imunoterapiji (28, 29).

Pri vseh terapevtskih poizkusih, ki vzpodbujajo Th1 odziv, pa obstaja potencialna nevar-

nost nastanka Th1 posredovanih obolenj, kot so avtoimune bolezni, sladkorna bolezen in KVČB. Ta skrb še posebno velja pri otrocih (9).

## GENSKO ZDRAVLJENJE

Ker so atopijske bolezni poligenske, ni veliko upanja, da bo genska terapija pomembno prispevala k njihovemu zdravljenju. Razumevanje genetske osnove astme pa pomaga pri prepoznavanju novih molekularnih tarč. V terapiji astme največ obeta zaviranje izražanja genov s tehnologijo protismiselnih oligonukleotidov ali RNKi (30).

Protismiselni oligonukleotidi so enovijačni odseki DNK ali RNK, ki se komplementarno vežejo z endogeno mRNA in na ta način inhibirajo sintezo točno določenega proteina. Na živalskem modelu astme so preizkušali uporabo protismiselnega oligonukleotida proti A1 adenozijskemu receptorju, ki je vpleten v degranulacijo mastocitov. Podobno deluje tudi tehnologija RNKi – interferenčna RNA. Gre za dvojnovijačne RNK molekule, ki se po vstopu v celico s pomočjo encima Dicer cepijo v majhne interferenčne RNK (si-RNK), te pa s pomočjo encimskega kompleksa RISC specifično razgrajujejo mRNK in tako zavrejo izražanje določenih genov. Tehnologija protismiselnih oligonukleotidov in RNKi omogoča izdelavo selektivnih zdravil proti natančno določenim tarčam (3, 31).

## ZAKLJUČEK

Teoretično in na živalskih modelih obstajajo številni novi terapevtski pristopi pri zdravljenju astme. Najobetavnejša potencialna biološka zdravila pri astmi so prikazana v tabeli 1.

Ker so inhalacijski glukokortikoidi za večino astmatikov sicer le delno učinkovito, a dokaj varno zdravilo, je potreba po uvajanju novih zdravil manjša. Kljub temu obstaja potreba po bolj specifičnih in varnejših protiastmatičnih zdravilih. Če bodo ta na voljo tudi v peroralni obliki, bodo hkrati učinkovita tudi proti ostalim atopijskim boleznim. Zdravila, ki bo trajno ozdravilo astmo, še ni na vidiku, več pa je možnosti za preprečitev nastanka alergije in astme. Fenotip astme sestoji iz številnih funkcionalnih in pato-

Tabela 1. Najobetavnejša biološka zdravila pri astmi in njihove tarče. *TNF $\alpha$*  – faktor tumorske nekroze alfa, *VLA4* – zelo pozni (angl. very late) antigen 4, *IgE* – imunoglobulini razreda E.

Molekularna tarča	Vrsta biološkega zdravila	Ime	Protiastmatici učinek
Interleukin 5	Monoklonalna protitelesa	Mepulumab	Zmanjšanje eozinofilnega vnetja
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	Receptor	Etanercept	Vpliv na mastocite in gladke mišice
VLA4	Monoklonalna protitelesa	Natalizumab	Blokada celične adhezije, zmanjšanje infiltracije vnetnic
IgE	Monoklonalna protitelesa	Omalizumab	Zmanjšanje eozinofilnega vnetja in zavora predstavitve antigena

morfoloških komponent. Najpomembnejše med njimi so: preodzivnost dihal, preveliko izločanje mukusa, eozinofilno ali nevtrofilno vnetje, hiperplazija gladkih mišic ter nalaganje medceličnega matriksa in kolagena. Neodvisnost regulacije teh komponent je v poteku bolezni vse večja. Zato je pri razvoju protiastmaticnih zdravil nesmiselno iskati eno samo

tarčo. Raziskave je potrebno usmeriti tudi v izvor nastanka astme. Natančneje je potrebno raziskati mehanizme senzibilizacije, interakcije med genotipom in okoljem ter vpliv mikrobov pri nastanku astme. Vsekakor pa boljše razumevanje molekularnih mehanizmov astme vodi v določitev novih terapevtskih tarč.

## LITERATURA

- Sands BE. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 1997; 3 (2): 95–113.
- Rabe KF, Vermeire PA, Soriano JB, et al. Clinical management of asthma in 1999: the Asthma Insights and Reality in Europe (AIRE) study. *Eur Respir J.* 2000; 16 (5): 802–7.
- Boushey HA. New and exploratory therapies for asthma. *Chest.* 2003; 123 (3): 439–45.
- Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, et al. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* 2001; 2 (2): 71–9.
- Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, et al. Eosinophils role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167 (2): 199–204.
- Boushey HA, Fahy JV. Targeting cytokines in asthma therapy: round one. *Lancet.* 2000; 356 (9248): 2114–6.
- Steinke JW, Borish L. Th-2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res.* 2001; 2 (2): 66–70.
- Shanafelt AB, Forte CP, Kasper JJ, et al. An immune cell-selective interleukin-4 agonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 (16): 9454–8.
- Barnes PB. Potential applications of new drugs in the management of childhood asthma. In: Szeffler SJ, Pedersen S, eds. *Childhood asthma.* 1st ed. New York: Taylor&Francis group LLC; 2006. p. 605–50.
- Wills-Karp M, Chiaramonte M. Interleukin-13 in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003; 9 (1): 21–7.
- Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996; 183 (1): 109–17.
- Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 102 (3): 344–50.
- Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, et al. Tumour necrosis factor (TNF  $\alpha$ ) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax.* 2005; 60 (12): 1012–8.
- Brightling C, Berry M, Amrani Y. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121 (1): 5–10.
- Barnes PJ. Endogenous inhibitory mechanisms in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161 (3 Pt 2): 176–81.
- Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, et al. The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 95 (1): 133–5.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T-cell responses. *Immunity.* 2003; 19 (5): 641–4.
- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 217–42.
- Stenton GR, Ulanova M, Dery RE, et al. Inhibition of allergic inflammation in the airways using aerosolized antisense to Syk kinase. *J Immunol.* 2002; 169 (2): 1028–36.

20. Tamaoki J, Kondo M, Sakai N, et al. Effect of suplatast tosilate, a Th2 cytokine inhibitor, on steroid-dependent asthma: a double-blind randomised study. *Lancet*. 2000; 356 (9226): 273–8.
21. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003; 348 (1): 24–32.
22. Djukanovic R. The role of co-stimulation in airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30 Suppl 1: 46–50.
23. Djukanovic R, Wilson SJ, Kraft M, et al. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170 (6): 583–93.
24. Miller CW, Krishnaswamy N, Johnston C, et al. Severe asthma and the omalizumab option. *Clin Mol Allergy*. 2008; 6: 4.
25. Strek ME. Difficult Asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3 (1): 116–23.
26. Choi IS, Koh YI. Therapeutic effects of BCG vaccination in adult asthmatic patients: a randomized, controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002; 88 (6): 584–91.
27. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001; 358 (9288): 1129–33.
28. Shirota H, Sano K, Kikuchi T, et al. Regulation of T-helper type 2 cell and airway eosinophilia by transmucosal coadministration of antigen and oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22 (2): 176–82.
29. Agrawal S, Kandimalla ER. Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA. *Trends Mol Med*. 2002; 8 (3): 114–21.
30. Cookson WO. Asthma genetics. *Chest*. 2002; 121 Suppl 3: 7–13.
31. Holgate S. Adenosine provocation: a new test for allergic type airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165 (3): 317–8.

Prispelo 31. 3. 2009

Margareta Strojjan Fležar<sup>1</sup>

# Citopatološka diagnostika raka sečnega mehurja v urinu in izpirku iz sečnega mehurja

*Cytopathologic Diagnosis of Bladder Cancer in Urine and Bladder Washings*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** sečni mehur, novotvorbe, patologija, urinska citodiagnostika

Citopatološka preiskava urina in izpirka sečnega mehurja je enostavna metoda za diagnostiko primarnega karcinoma sečnega mehurja pri bolnikih s hematurijo in drugimi simptomi obolenja uropoetskega trakta. Pomembna je tudi za spremljanje bolnikov po zdravljenju z namenom odkrivanja morebitnih ponovitev bolezni, ki so pri bolnikih z rakom sečnega mehurja razmeroma pogoste. S citopatološko preiskavo zanesljivo prepoznamo urotelijske karcinome visokega gradusa, metoda pa je manj uporabna za prepoznavo urotelijskih karcinomov nizkega gradusa. Zanesljivo prepoznamo celice z jasno izraženimi znaki malignosti tudi pri intraepitelijskem urotelijskem karcinomu, ne moremo pa točno opredeliti, ali je karcinom invaziven. K boljšim rezultatom citopatološke preiskave pomembno prispeva pravilen odvzem in prenos vzorca urina ali izpirka, ki naj mu sledi standardizirana obdelava vzorcev v citopatološkem laboratoriju. V zadnjem desetletju se pojavljajo nove dodatne metode, ki naj bi izboljšale citopatološko prepoznavo raka sečnega mehurja v dvomljivih primerih. Med novimi metodami največ obeta test *UroVysion*, pri katerem z metodo fluorescenčne *in situ* hibridizacije ugotavljamo citogenetske spremembe, ki so značilne za urotelijske karcinome različnih gradusov.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** bladder neoplasms, pathology, urine cytodiagnosis

The cytopathologic examination of urine and bladder washings is a simple method for the detection of primary bladder cancer in symptomatic patients or in patients with hematuria. This method is very useful for follow-up of patients after treatment in order to detect recurrence of bladder cancer, which occurs in a significant percentage of patients. Cytopathologic examination is very reliable for the diagnosis of high grade urothelial carcinoma, but it is less useful for the detection of low grade urothelial neoplasms. Cells with obvious morphological signs of malignancy can be reliably recognised as such also in the case of intraepithelial urothelial carcinoma. However, as isolated malignant cells are involved, they cannot be reliably assessed concerning their invasive potential. The proper handling and transport of urine or bladder washings, as well as standardised procedures in the cytopathology laboratory, are very important to achieve the best possible results of cytopathologic examination. In the last decade, several new methods have also emerged in attempt to improve the cytopathologic examination of bladder cancer in doubtful cases. Among these, the *UroVysion* test is the most promising one. By using the method of fluorescent *in situ* hybridisation, this test can detect several cytogenetic changes characteristic of bladder cancer of various grades.

---

<sup>1</sup> Doc. dr. Margareta Strojjan Fležar, dr. med., Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Korytkova 2, 1000 Ljubljana; margareta.strojjan-flezar@mf.uni-lj.si

## UVOD

Svetlobnomikroskopska preiskava celic v urinu in drugih celičnih vzorcev iz votlega sistema urinarnega trakta je enostavna, še vedno uporabna in poceni diagnostična metoda (1-3). Najpogostejša klinična napotna diagnoza, ki spremlja tovrstne celične vzorce, je hematURIJA, bodisi mikro- ali makroskopska. Ta je lahko prvi znak primarnega tumorja v sečnem mehurju, redkeje pa tumorja v zgornjem delu votlega sistema sečne poti (4-6). Druga najpogostejša napotna diagnoza je predhodni, že zdravljjen tumor sečnega mehurja (1). Tumorji sečnega mehurja se namreč pogosto ponavljajo, lahko pa napredujejo v agresivnejšo obliko bolezni (7).

Pregled urina je eden izmed najstarejših medicinskih diagnostičnih postopkov. Iz Kahunovega papirusa, ki je nastal okoli leta 1900 pr. n. št., je razvidno, da so že stari Egipčani vedeli, da je krvav urin lahko znak raka sečnega mehurja, ki ga je v tistem delu sveta povzročala (in ga še vedno) *Schistosoma haematobium* (1, 8). Začetek svetlobnomikroskopskega pregleda celic iz urina je zabeležen leta 1856, ko je Lamb, češki zdravnik, uporabil mikroskop za pregled sedimenta urina (1, 8).

V sodobni medicini od diagnostične metode pričakujemo, da zagotovi čim hitrejšo diagnozo patološkega procesa. Izvide citopatološke preiskave urina ali izpirka iz mehurja kliniki lahko dobijo v 1 do 2 dneh. Citopatološki pregled celic iz urina ali izpirka iz sečnega mehurja ima določene prednosti, a tudi omejitve. S citopatološko preiskavo zelo zanesljivo prepoznamo predvsem urotelijske karcinome visoke stopnje malignosti (visokega gradusa) in intraepitelijske karcinome (lat. *carcinoma in situ*, CIS), ki imajo jasno izražene celične in jedrne znake malignosti (1, 9, 10). Nasprotno pa s to preiskavo ne moremo zanesljivo opredeliti celic papilarnega urotelijskega karcinoma nizke stopnje malignosti (nizkega gradusa), ker so pri teh neoplazmah celični in jedrni znaki malignosti slabo izraženi (1, 10, 11). Dodatna težava je, da iz celičnega vzorca ne moremo opredeliti izvora malignih celic. Maligne celice s povsem enako morfološko sliko v urinu lahko izvirajo iz katerega koli dela votlega sistema sečne poti,

kar kliniku pri iskanju primarnega tumorja lahko povzroči diagnostične zadrege.

Citopatološka preiskava urina je pomembna metoda za spremljanje bolnikov po zdravljenju raka sečnega mehurja in drugih delov votlega sistema urinarnega trakta (1). S pregledovanjem celic v vzorcih urina ali izpirkov iz sečnega mehurja skušamo pravočasno odkriti ponovitev bolezni ali morebitni nov primarni tumor, posredno pa lahko na ta način ocenjujemo tudi učinek zdravljenja.

Izjemoma citopatološko preiskavo urina uporabljamo v sekundarni preventivi delavcev, pri katerih je zaradi izpostavljenosti kemičnim kancerogenim snovem stopnja tveganja za nastanek raka v sečnem mehurju visoka (1).

## CELIČNI VZORCI IZ SEČNEGA MEHURJA IN VOTLEGA SISTEMA SEČNE POTI: PRIPRAVA ZA SVETLOBNOMIKROSKOPSKI PREGLED

Najpogostejši vzorci, ki jih kliniki pošljejo v citopatološko preiskavo, so spontano izločeni urin in izpirki iz sečnega mehurja. Občasno dobimo v preiskavo urin, selektivno odvzet iz sečevoda ali ledvičnega meha, pa tudi vzorce urina iz katetra ali nefrostome.

Pri spontano izločenem urinu moramo vedeti, da je v jutranjem urinu največ odluščanih celic. Ker te niso več del epitelijskega, ki štiti, so izpostavljene kislemu pH urina in drugim organskim snovem. Urin zaradi tega ni izotoničen, kar pospeši propadanje odluščanih celic (2). Morfološko so te slabo ohranjene in niso primerne za citopatološko preiskavo. Zato je priporočljivo, da v preiskavo pošljemo drugi jutranji urin. Ker se celice v urin neenakomerno luščijo z urotelija, ki prekriva steno sečnega mehurja, priporočamo pregled vzorcev urina treh zaporednih dni (2). Bolnike moramo poučiti, kako pravilno zberejo urin v poseben urinski lonček (slika 1). Spolovilo mora biti pred odvzemom čisto, sicer curek urina spere odluščene odmrle celice ploščatega epitelijskega bakterije s površine telesa. Pri ženskah je urinu lahko primešana še sluz izločkov iz nožnice. Citopatološka preiskava takšnega vzorca je manj zanesljiva, saj so urotelijske celice slabo pregledne ali pa so povsem

**Spontan urin:**

- Bolnik očisti spolovilo, nato pa srednji curek drugega jutranjega urina ujame v urinski lonček in ga dobro zapre.
- Za citopatološko preiskavo potrebujemo 50–120 ml urina.
- Vzorci naj bi bili dostavljeni v laboratorij v največ treh urah po odvzemu.
- Če to ni mogoče, jih prefiksiramo: dolijemo enak volumen 50 % etanola s polietilenglikolom (angl. *carbowax*).

**Izpirek iz sečnega mehurja:**

- Za pripravo izpirka mehurja priporočamo uporabo fiziološke raztopine, ki optimalno ohrani morfologijo celic.
- Za preiskavo potrebujemo 50–120 ml vzorca.
- Vzorci naj bi bili dostavljeni v laboratorij v največ treh urah po odvzemu.
- Če to ni mogoče, jih prefiksiramo: dolijemo enak volumen 50 % etanola s polietilenglikolom (angl. *carbowax*).

Vsak vzorec mora spremljati ustrezna **napotnica za citopatološko preiskavo** z naslednjimi podatki:

- ime in priimek bolnika,
- datum rojstva,
- naslov stalnega prebivališča bolnika,
- naročnik (ime oddelka in zdravnika),
- datum in ura odvzema vzorca,
- vrsta vzorca (spontan urin, izpirek mehurja, urin iz katetra, drugo) in
- klinični podatki.

**Na posodi z vzorcem mora biti napisano IME in PRIIMEK bolnika oziroma NALEPKA S PODATKI o bolniku.**

Slika 1. Navodila za odvzem in pošiljanje urina in izpirka iz sečnega mehurja za citopatološko preiskavo.

prekrite s celicami ploščatega epitelija, bakterijami, celičnim drobirjem in sluzjo.

Tako pridobljene tekočinske celične vzorce moramo po odvzemu čim prej, najkasneje pa v 3 urah, poslati v laboratorij (slika 1). Če takojšen prenos ni mogoč, lahko vzorce delno fiksiramo z dolivanjem mešanice 50 % etanola s polietilenglikolom (angl. *carbowax*). Dolijemo enak volumen mešanice, kot je urina v lončku.

Ker so celice v tekočinskih vzorcih močno razredčene, jih v laboratoriju zgoščujemo na različne načine (2, 12). Številni laboratoriji urinske vzorce in izpirke iz sečnega mehurja centrifugirajo, iz sedimenta, ki vsebuje zgoščene celice, pa naredijo direkten razmaz celic na objektno stekelce. V laboratoriju Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IP MF UL) uporabljamo membransko filtracijo. Pri tej metodi celično suspenzijo s pomočjo podtlaka filtriramo skozi polikarbonatni ali celulozni membranski filter, ki ima 5 µm velike pore. Po filtraciji ostanejo na filtru celice, ki so večje od 5 µm (uro-

telijske celice). Filter s celicami nato obrnemo na objektnik, ga pokrijemo s papirnim filtrom in z rahlim pritiskom prenesemo celice s filtra na objektnik. Za fiksacijo celic, ki smo jih prenesli na objektnik, je najprimernejši fiksativ, ki vsebuje poleg etanola še polietilenglikol, ker ta poveča adhezijo celic na objektnik. Med novejše in dražje tehnike priprave sodijo komercialno dostopne metode, ki se sicer uporabljajo za pripravo brisov materničnega vratu, vendar za zdaj ni prepričljivih dokazov, da izboljšajo rezultate citopatološke preiskave (13, 14). Tako pripravljene celične vzorce obarvamo z metodo po Papanicolaou (12).

## ZANESLJIVOST CITOPATOLOŠKE DIAGNOZE

Po Kossu je ocena točnosti citološke diagnoze v citologiji urina odvisna od pričakovani opazovalca (1). Citološke diagnoze malignosti ne moremo postaviti, če s svetlobnomikroskopskim pregledom vzorca ne najdemo celic z morfološki znaki malignosti. Dobro dife-



rencirani (neinvazijski) papilarni tumorji (papilomi in papilarni tumorji nizkega gradusa) luščijo celice, ki nimajo prepričljivih celičnih in jedrnih atipij in jih zato s citopatološko preiskavo ne moremo prepoznati kot maligne. V literaturi navajajo pri tej vrsti tumorjev zelo različno diagnostično zanesljivost citopatološke preiskave, ki niha od 0 do 88%, najpogosteje pa navajajo zanesljivost od 25 do 40% (1, 10, 15).

Morfološko izrazitejša atipija je povezana z višjim gradusom tumorjev. Papilarne tumorje gradusa II in III pravilno ocenimo v 72% (1). Med papilarnimi tumorji najzanesljujeve ocenimo tumorje gradusa III, pri katerih je citopatološka diagnoza pravilna v 91% (1). Citopatološka diagnoza je najzanesljujejša (96%) v diagnostiki invazijskih urotelijskih karcinomov in intraepitelijskega karcinoma, s katerih se luščijo celice z značilnimi morfološkiimi znaki malignosti (1).

V citopatološkem izvidu se lahko pojavlja tudi diagnoza atipije urotelijskih celic, ki je ne moremo nadalje zanesljivo opredeliti. Atipija urotelijskih celic je lahko povezana s kamni v urinarnem traktu, z vnetnimi procesi, ali pa je posledica predhodnih diagnostičnih in/ali terapevtskih posegov (2). Ker spremembe na urotelijskih celicah niso dovolj značilne za proces, ki je spremembe sprožil, ga iz citološkega vzorca ne moremo natančneje opredeliti. Atipične celice pa ne nazadnje lahko pripadajo tudi papilarnemu tumorju nizkega gradusa, zato ga včasih ne moremo zanesljivo izključiti iz diagnoze.

## DODATNE DIAGNOSTIČNE METODE V CITOPATOLOGIJI UROTELIJSKIH TUMORJEV

Za izboljšanje neinvazivne diagnostike karcinoma sečnega mehurja potrebujemo ob standardni citopatološki preiskavi dodatne diagnostične metode. V literaturi obstajajo poročila o različnih novejših biokemičnih in molekularnih metodah, na primer test BTA (angl. *bladder tumor antigen*), test NMP-22, *Immunocyt* in druge, ki pa niso dovolj občutljive ali specifične, zato se niso uveljavile v rutinski diagnostiki (16). V Sloveniji imamo na področju dodatne citopatološke diagnostike urina in izpirkov iz sečnega mehurja izkušnje

na področju merjenja DNA-ploidije (Onkološki inštitut Ljubljana) (17). V zadnjih mesecih pa pridobivamo izkušnje s testom *UroVysion*, ki temelji na metodi fluorescenčne *in situ* hibridizacije (IP MF UL) (18).

## DNA-ploidija

V vzorcu urina ali izpirka iz sečnega mehurja lahko s slikovnim ali pretočnim citometrom izmerimo DNA-ploidijo, ki odraža celokupno količino DNA (celoten genetski material) v preiskovani celični populaciji (16). S pretočnim citometrom izmerimo količino DNA v velikem številu celic (> 10.000) v kratkem času (v nekaj minutah), vendar preiskovanih celic ne moremo videti, ker jih merimo v zaprtem sistemu, na koncu pa zavržemo. V množici izmerjenih signalov ne moremo razločiti klonov maloštevilnih aneuploidnih celic, ki morda pomembno prispevajo k biološkemu potencialu preiskovanega tumorja. Prav prepoznavanje majhnih aneuploidnih klonov in posamičnih celic z veliko količino DNA (> 5c DNA) je prednost analize DNA-ploidije s sodobnim slikovnim citometrom (19). 1c je enota za količino DNA, ki ustreza polovici povprečne jedrne količine DNA v normalni (nespremenjeni) diploidni populaciji celic v fazi G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> celičnega ciklusa. Slikovni citometer omogoča vidni nadzor nad celicami s svetlobnim mikroskopom, ki je del sistema, celice pa so fiksirane na objektnem stekelcu. Zato lahko ločimo ohranjene celice z veliko količino DNA od artefaktov ali skupkov celic v višjih ploidnih območjih, kar pri pretočno citometričnih meritvah ni mogoče. Sodobni slikovni citometri so zaradi zmogljivejših računalnikov tudi hitrejši in omogočajo analizo več tisoč celic v kratkem času (19, 20).

Raziskave DNA-ploidije urotelijskih karcinomov so pokazale, da je večina neinvazijskih papilarnih karcinomov nizkega gradusa diploidnih, medtem ko so papilarni karcinomi gradusa II v polovici primerov diploidni, v drugi polovici pa aneuploidni (21). Urotelijski papilarni karcinomi gradusa III in CIS so praviloma aneuploidni (20). Če analiza DNA-ploidije pokaže diploiden vzorec (kar je enako količini DNA v normalnih celicah), potem ne razreši vprašanja, ali so v vzorcu maligne celice ali ne. V nekaterih primerih so potrdili, da DNA-ploidijo zanesljujeve opre-

delijo s slikovnim citometrom, ker ta omogoča razpoznavo majhnih klonov aneuploidnih celic, ki se pri merjenju s pretočnim citometrom izgubijo med množico diploidnih celic (19). Dejstvo pa je, da podobno kot citologija merjenje DNA-ploidije ne prispeva k zanesljivejši diagnostiki papilarnih urotelijskih neoplazem nizke stopnje malignosti oziroma karcinomov nizkega gradusa (1, 21).

### **Fluorescenčna *in situ* hibridizacija (FISH)**

Pri metodi fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH) uporabljamo fluorescenčno označene DNA-sonde, ki prepoznavajo različne kromosomske spremembe v celicah, vključno z aneuplosomijo (spremenjeno število kopij kromosomov), duplikacijo, amplifikacijo, delecijo in translokacijo (22). Obstajata dva tipa sond: sonde, ki označujejo število kromosomov (angl. *chromosome enumeration probes*, CEP) in se vežejo na centromere kromosomov, ter za lokus specifični označevalci (angl. *locus specific indicator*, LSI). CEP sonde odkrivajo aneuplosomijo, LSI sonde pa duplikacijo, amplifikacijo ali delecijo določenih genov (22).

V celicah urotelijskega karcinoma so našli tipične citogenetske spremembe. Število večine kromosomov je bilo pomnoženo, našli pa so tudi delecije na predelih 9p in 9q. Raziskave so pokazale, da so pri urotelijskih karcinomih visokega gradusa pogostejše spremembe na kromosomih 3, 4, 8, 11, 17 in 18, pri karcinomih nizkega gradusa pa so našli povečano število kromosomov 1 in 7 (trisomija) in spremembe na kromosomu 9 (23, 24). Prva poročila o možni uporabi metode FISH za prepoznavanje celic raka sečnega mehurja v urinu in izpirkih iz sečnega mehurja najdemo v literaturi iz devetdesetih let prejšnjega stoletja (22). Spoznanja so bila osnova za izdelavo komercialno dostopnega testa *UroVysion* (*Vysis/Abbott, Downers Grove IL, ZDA*), ki uporablja sonde za tarče na več kromosomih, posamezne sonde pa so različnih barv (18). S testom *UroVysion* prepoznamo aneuploidijo kromosomov 3 (CEP3 sonda), 7 (CEP7 sonda), 17 (CEP17 sonda) in izgubo lokusa 9p21 (LSI9p21 sonda).

Test *UroVysion* je hitra, enostavna in zanesljiva metoda z visoko občutljivostjo ter specifičnostjo za prepoznavanje celic raka seč-

nega mehurja v urinu in izpirkih iz sečnega mehurja (25, 26). Z uporabo tega testa lahko ob standardni citopatološki preiskavi, ki ima podobno specifičnost, vendar znatno nižjo občutljivost, izboljšamo prepoznavanje primarnih urotelijskih karcinomov in ponovitev bolezni. V novejših člankih poročajo, da test *UroVysion* zazna genetske spremembe pred nastankom morfoloških sprememb urotelijskih celic, ko tumor tudi cistoskopsko še ni viden, in s tem napoveduje njegovo ponovitev (27).

### **PRIMERI IZ VSAKDANJEGA DELA**

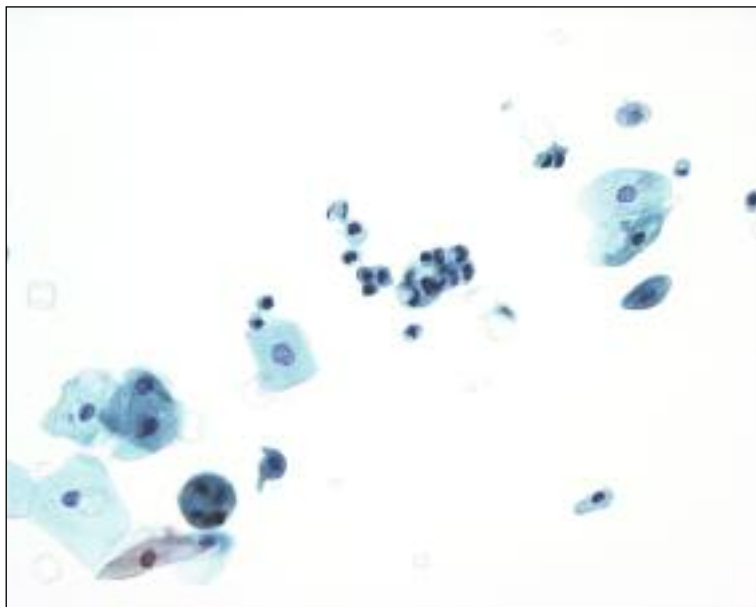
**Primer 1: Citopatološka diagnoza urina: negativno. Histopatološka diagnoza: urotelijski papilarni karcinom nizkega gradusa brez invazije.**

V citopatološko preiskavo smo dobili vzorec urina 61-letnega bolnika z napotno diagnozo »stanje po transuretralni resekciji recidivnih papilomov sečnika«. V računalniški bazi preiskav IP MF UL so bili shranjeni izvidi številnih biopsij sečnega mehurja, ki so bile narejene pri tem bolniku v preteklih 6 letih. V biopsijah izpred 3 in 4 let je bila postavljena diagnoza urotelijskega papilarnega karcinoma sečnega mehurja gradusa I/pTa brez invazijske rašče.

Pri svetlobnomikroskopskem pregledu vzorca urina smo v zmerno celularnem vzorcu našli disociirane celice vrhnjega sloja urotelija. Med njimi je bilo nekaj slabo ohranjenih celic, ki jih nismo mogli oceniti. V ozadju so bili še posamezni nevtrofilni granulociti in redki eritrociti ter nekaj celic ploščatega epitelija in vrhnjega sloja urotelija (slika 2). V citopatološki izvid smo zato zapisali, da v vzorcu ni malignih celic.

Čez 7 mesecev je sledila transuretralna resekcija cistoskopsko vidnih papilomov v sečniku. Histopatološki pregled je pokazal papilarni urotelijski karcinom nizkega gradusa brez invazije (pTa).

Po operaciji so bolnika spremljali in poslali v citopatološko preiskavo en vzorec urina po dveh mesecih in 3 vzorce urina šest mesecev po posegu. V nobenem ni bilo malignih celic, vidne so bile samo reaktivne spremembe na urotelijskih celicah in vnetnice.



Slika 2. Skupek slabo ohranjenih celic in posamezne celice vrhnjega sloja urotelija (Papanicolaou, 400×).

**Primer 2: Citopatološka diagnoza izpirka iz sečnega mehurja: sum, da gre za urotelijski karcinom. Histopatološka diagnoza: urotelijski papilarni karcinom nizkega gradusa brez invazije in CIS.**

V citopatološko preiskavo smo dobili izpirek iz sečnega mehurja 62-letnega bolnika z napotno diagnozo »stanje po transuretralni resekciji tumorja sečnega mehurja (T1GII)«. V računalniški bazi preiskav IP MF UL smo našli izvid biopsije sečnega mehurja, ki je bila opravljena leto poprej. Takratna histopatološka diagnoza je bila papilarni in invazijski urotelijski karcinom sečnega mehurja visokega gradusa/pT1.

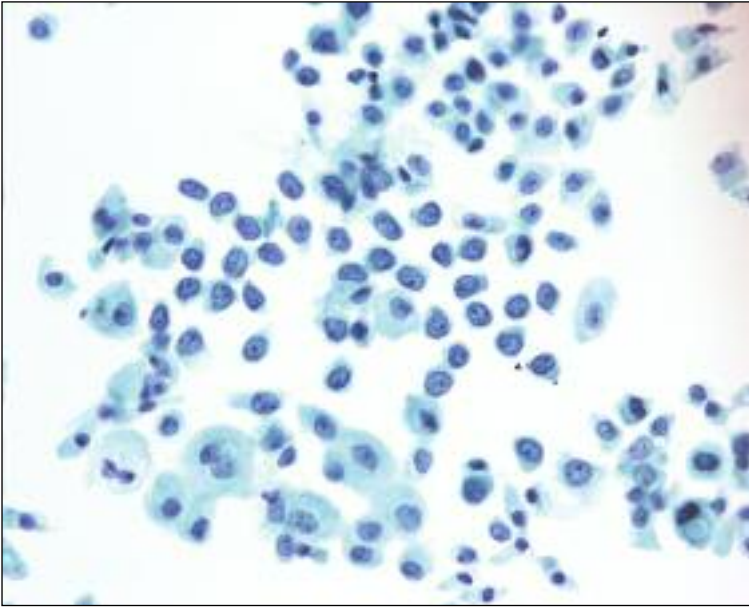
Pri svetlobnomikroskopskem pregledu celičnega vzorca izpirka sečnega mehurja smo našli zmerno celularen vzorec, ki so ga sestavljale manjše krpe in rahle, slabo kohezivne skupine ter disociirane celice večinoma vrhnjega sloja urotelija. Posamezne celice so imele nekoliko povečana, različno velika jedra, vidna so bila drobna jedrca. Citoplazma teh celic je bila zmerno obilna in dobro omejena. V ozadju so bili še posamezni nevtrofilni granulociti in redki eritrociti ter nekaj celic

ploščatega epitelijskega. V citopatološki diagnozi smo zapisali, da v vzorcu ni malignih celic, prisotne pa so reaktivne spremembe in blaga atipija urotelija.

Štiri mesece kasneje so ponovno poslali v citopatološki pregled izpirek iz sečnega mehurja. Takrat so bile v vzorcu prisotne tudi posamične atipične celice s povečanimi jedri, ki so bila različnih oblik in velikosti. Kromatinska struktura in jedrna membrana sta bili poudarjeni. Citoplazma teh celic je bila pičla. Zmerna celična in jedrna atipija sta vzbujali sum, da se pojavlja urotelijski karcinom (slika 3).

Čez mesec in pol je sledila transuretralna resekcija cistoskopsko vidnih tumorjev v sečniku. Histopatološki pregled je pokazal papilarni urotelijski karcinom nizkega gradusa brez invazije (pTa) in CIS.

Po operaciji je bolnik dobival intravezikalno imunoterapijo z *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), ki je oslavljen *Mycobacterium bovis* in se uporablja za zdravljenje CIS. Mesec dni po zaključku imunoterapije z BCG so ponovno poslali v citopatološko preiskavo izpirek iz sečnega mehurja (4 mesece po resekciji tumorja). Pri citopatološkem pregledu smo ugotovili, da



Slika 3. Urotelijske celice z zmerno celično in jedrno atipijo (Papanicolaou, 400 $\times$ ).

so poleg reaktivnih sprememb na celicah zaradi zdravljenja še vedno prisotne posamezne hudo atipične celice, ki so vzbujale sum, da se pojavlja urotelijski karcinom. Zato so ponovili transuretralno resekcijo tumorjev v sečnem mehurju. Histopatološki pregled je ponovno potrdil, da je bil prisoten papilarni urotelijski karcinom nizkega gradusa brez invazije. Bolnika je treba še naprej spremljati s citopatološkimi pregledi izpirkov iz sečnega mehurja in cistoskopijo.

**Primer 3: Citopatološka diagnoza izpirka iz sečnega mehurja: pozitivno, urotelijski karcinom. Histopatološka diagnoza: papilarni urotelijski karcinom visokega gradusa brez invazije.**

V citopatološko preiskavo so poslali izpirek iz sečnega mehurja 79-letnega bolnika. Pri cistoskopiji so opisovali resičast širokobazni tumor na sprednji steni sečnega mehurja. Celični vzorec so sestavljale slabo kohezivne skupine in disociirane maligne celice urotelijskega karcinoma. Celice so imele jasno izražene celične in jedrne znake malignosti. Jedrno-ci-

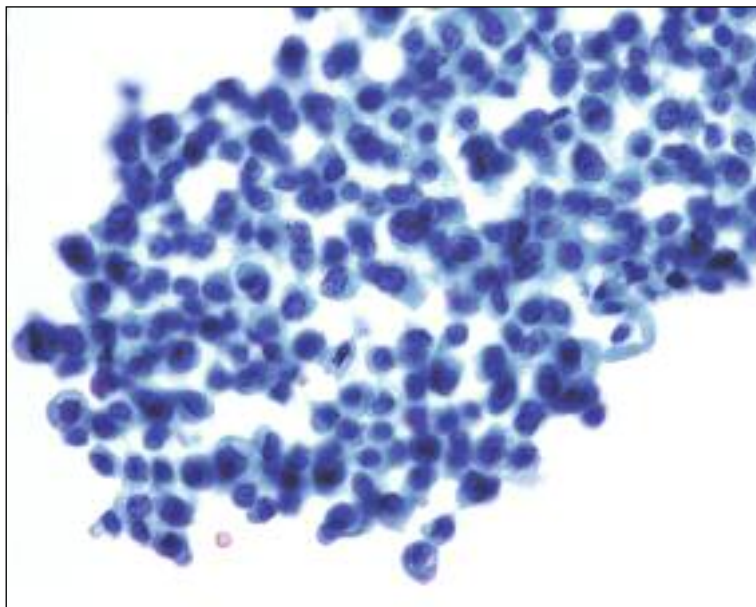
toplazemsko razmerje je bilo povečano v korist jedra. Jedra so bila povečana, nepravilnih oblik, razlikovala so se po velikosti in obliki. Kromatin je bil pomnožen in neenakomerno razporejen. Citoplazma teh celic je bila pičla do zmerno obilna. V vzorcu so bile le maloštevilne normalne urotelijske celice (slika 4).

Napravili so transuretralno resekcijo tumorja in histopatološka preiskava je potrdila papilarni urotelijski karcinom visokega gradusa brez invazije (pTa).

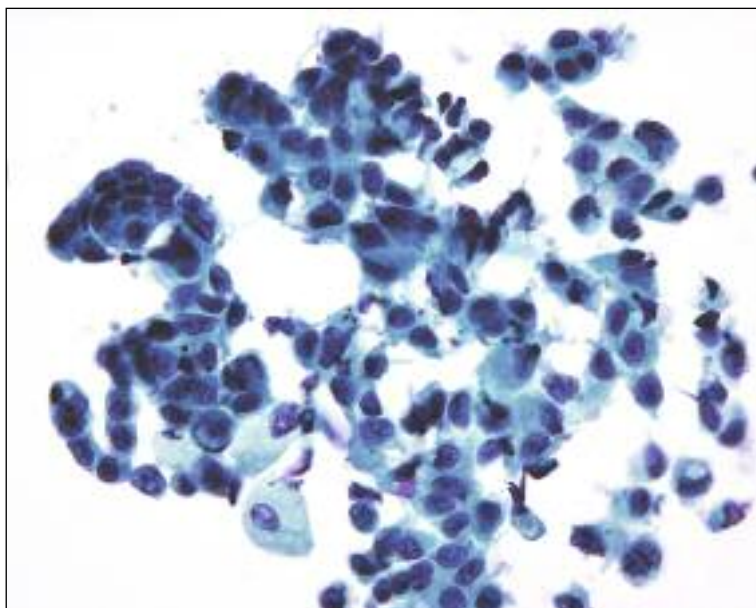
**Primer 4. Citopatološka diagnoza izpirka iz sečnega mehurja: pozitivno, urotelijski karcinom. Histopatološka diagnoza: invazijski urotelijski karcinom visokega gradusa.**

V citopatološko preiskavo so poslali izpirek sečnega mehurja 63-letnega bolnika, ki je zbolel za hematurijo. Pri cistoskopskem pregledu so ugotavljali tumor sečnega mehurja.

V celičnem vzorcu smo našli številne maligne celice urotelijskega karcinoma, ki so bile v večjih skupinah ali pa so ležale posamično. Celice so imele jasno izražene celične



Slika 4. Slabo kohezivne skupine in disociirane urotelijske maligne celice z jasno izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti (Papanicolaou, 400 $\times$ ).



Slika 5. Maligne urotelijske celice visokega gradusa (Papanicolaou, 400 $\times$ ).

in jedrne znake malignosti. Prisotne so bile tudi patološke mitoze in kanibalizem (slika 5).

Še v istem mesecu je bila opravljena transuretralna resekcija mehurja. Histopatološka preiskava je potrdila multifokalen invazijski urotelijski karcinom visokega gradusa z invazijo v mišice. Zaradi slednjega so bolniku operativno odstranili sečni mehur s prostato in obturatornimi bezgavkami leve strani. Histopatološka preiskava je pokazala, da je v preostalem tkivu sečnega mehurja še obsežen invazijski urotelijski karcinom visokega gradusa, ki se vrašča v perivezikalno maščevje – pT3. Prisotni sta bili tudi perinevralna in limfovaskularna invazija.

**Primer 5: Citopatološka diagnoza izpirka iz sečnega mehurja: pozitivno, urotelijski karcinom. Histopatološka diagnoza: CIS urotelija in huda displazija urotelija.**

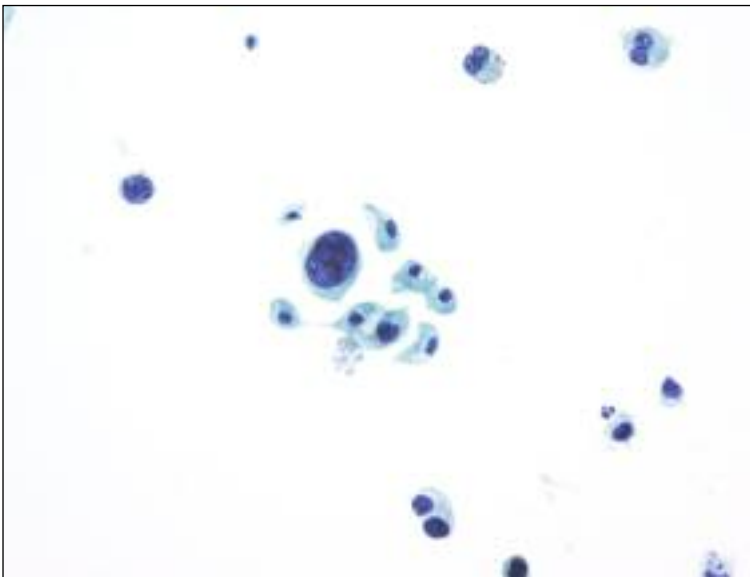
V citopatološko preiskavo so poslali urin 56-letnega bolnika s hematurijo ter ultrazvočno in

cistoskopsko postavljenim sumom, da ima bolnik karcinom sečnega mehurja.

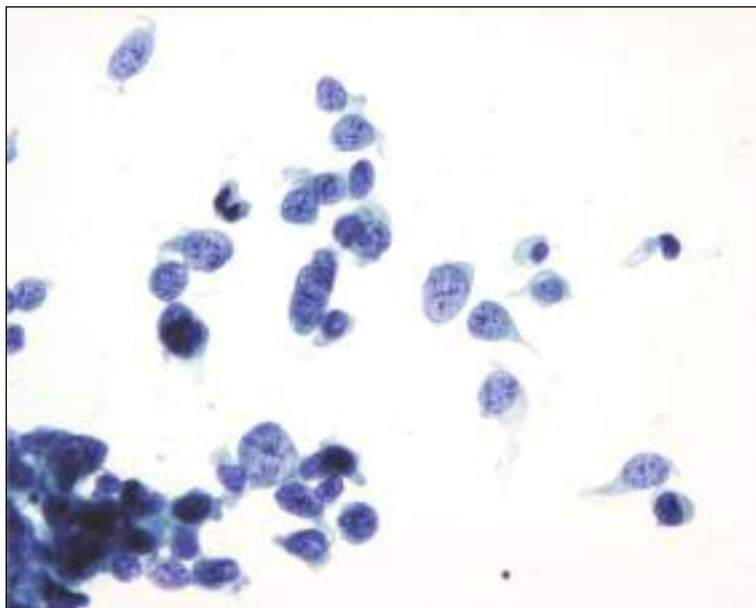
V celičnem vzorcu urina smo našli posamično ležeče maligne celice z jasno izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti. Številne celice so imele skrčena jedra z zgoščenim, temnim kromatinom brez vidne strukture, citoplazma je bila zgoščena. Te morfološke značilnosti odražajo propadanje celic. V ozadju je bilo še nekaj nevtrofilnih granulocitov in celic ploščatega epitelijskega (slika 6a).

Čez 3 mesece so ponovno poslali vzorec v citopatološko preiskavo z napotno diagnozo hematurija in sumom, da gre za karcinom sečnega mehurja, tokrat so poslali izpirek iz sečnega mehurja. V vzorcu smo našli številne skupine in disociirane celice z jasno izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti. Morfološka slika je ustrezala urotelijskemu karcinomu visokega gradusa (slika 6b).

Sledila je transuretralna resekcija tumorja v sečnem mehurju. S histopatološko preiskavo so ugotovili CIS urotelija in hudo displazijo urotelija. Invazijske rašče niso našli.



Slika 6a. Posamično ležeče maligne urotelijske celice z jasno izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti v urinu (Papanicolaou, 400 $\times$ ).



Slika 6b. Skupki in disociirane urotelijske celice z jasno izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti v izpirku sečnega mehurja (Papanicolaou, 400 $\times$ ).

## ZAKLJUČKI

Če razumemo osnove citopatološkega ocenjevanja vzorcev, ki sloni na opazovanju izoliranih celic ali celičnih skupin, ki so izgubile stik s prvotnim tkivom in njegovo strukturo, potem razumemo prednosti in omejitve citopatološke diagnostike urotelijskih tumorjev. Citopatološka preiskava urina je zelo uporabna neinvazivna metoda za diagnostiko primarnih tumorjev in spremljanje bolnikov po zdravljenju karcinoma sečnega mehurja ter drugih delov votlega sistema urinarnega trakta (primeri 2–5) (1, 3, 5, 6). Omogoča zanesljivo diagnostiko urotelijskih karcinomov, ki jih sestavljajo morfološko prepričljivo maligne celice (primeri 3–5), kar pomeni, da je zelo specifična, po drugi strani pa je diagnostika urotelijskih tumorjev s slabo izraženimi celičnimi in jedrnimi znaki malignosti nezanesljiva (primer 1) (1, 7, 10, 15).

V praksi lahko pride do razkoraka med izvidi diagnostičnih preiskav, ko ima bolnik za malignom sumljive klinične znake in/ali sumljiv izvid cistoskopije, izvid citopatološke

preiskave urina ali izpirka iz sečnega mehurja pa je negativen (primer 1). Citopatološka diagnoza namreč ni zanesljiva pri neinvazivskih papilarnih urotelijskih tumorjih nizkega gradusa, kamor po klasifikaciji Svetovne zdravstvene organizacije uvrščajo neinvazijski papilarni urotelijski karcinom nizkega gradusa, papilarno urotelijsko neoplazmo nizkega malignostnega potenciala in urotelijske papilome (primera 1 in 2) (1, 7, 11). Glede na objavljene podatke lahko v teh primerih citopatološko potrdimo tumor le v 25 do 40% (1, 10, 15). Za diagnostiko in spremljanje bolnikov z nizko malignimi papilarnimi tumorji so zato potrebne druge preiskave, ki so zanesljivejše, predvsem cistoskopija in slikovnodagnostične preiskave, saj so ti tumorji makroskopsko (cistoskopsko) vidni kot resičasti izrastki. Čeprav citopatološka diagnostika na tem področju odpove, pa ostaja dejstvo, da imamo opravka s tumorjem, ki nima morfološko prepričljivih malignih celic, zato jih kljub ponavljajočim se pregledom vzorcev urina ali izpirkov iz sečnega mehurja ne moremo prepoznati. Tumor



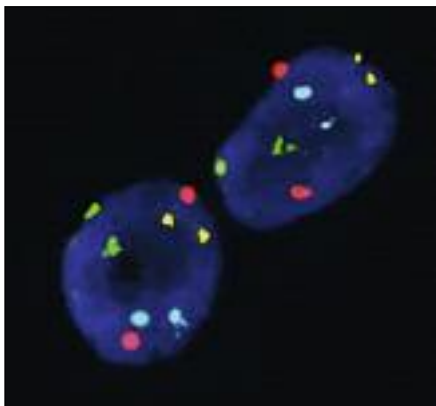
s takšnimi celicami je torej nizko malignen in ne ogroža bolnikovega življenja.

Druga skrajnost je za urotelijski karcinom pozitiven citopatološki izvid ob negativnem cistoskopskem izvidu. V določenih primerih najdemo v urinu (redkeje pa v izpirkih iz mehurja) morfološko jasno maligne celice, vendar s slikovnimi preiskavami in/ali cistoskopijo urologi tumorja ne najdejo. Sklepanje, da je citopatološka diagnoza napačna, če makroskopsko vidnega tumorja ni, je nevarno. Invazijski urotelijski karcinom lušči morfološko enake maligne celice kot CIS, ki je pri cistoskopiji lahko prikrit (1, 3). Citopatolog na podlagi pregleda izoliranih celic ne more ugotoviti, ali te pripadajo invazivnemu karcinomu ali CIS (primer 5). Iz vzorca, v katerem ni nekroze, vnetnih celic ali rdečih krvničk, lahko posredno sklepamo, da pripada CIS, ker ta zaradi narave svoje rasti ne sproža tako izrazitega imunskega odgovora organizma (1, 3). Vsekakor pa se moramo zavedati, da citopatološka diagnoza malignega tumorja pomeni, da imamo opraviti s tumorjem, ki ima jasno izražene celične znake malignosti (primeri 3–5). To pomeni, da je visokega gradusa in je bodisi že invazijski ali pa intraepitelijski, ki lahko preide v invazijskega, in da bo kot tak lahko ogrozil bolnikovo življenje. V teh primerih je zelo pomembna komunikacija med klinikom in citopatologom, nujne so nadaljnje diagnostične preiskave za odkritje primarnega tumorja. Cistoskopsko je

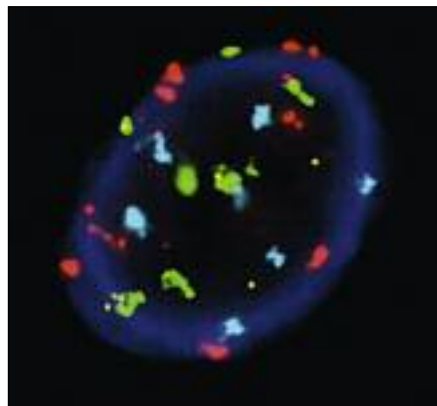
treba najti karcinom sečnega mehurja; če je izvid cistoskopije negativen, pa moramo vedno pomisliti tudi na možnost, da so celice v urinu odluščene iz prikritega karcinoma v sečevodu ali ledvičnem mehu.

Karcinom sečnega mehurja je v Sloveniji med vsemi raki pri moških na 7. mestu, pri ženskah pa je razmeroma redek (28). Pojavnost narašča in je bila po zadnjih podatkih Registra raka za Slovenijo v letu 2005 21,5/100.000 pri moških in 6,3/100.000 pri ženskah. Rak sečnega mehurja se začne pojavljati po 45. letu, največ primerov odkrijemo v starosti od 70 do 75 let pri moških in po 75. letu pri ženskah. Ob sumljivih kliničnih znakih, med katerimi je v ospredju neboleča hematurija, neinvazivna citopatološka preiskava urina pomaga izbirati bolnike za nadaljnje invazivne diagnostične posege; prva standardna (invazivna) diagnostična metoda je cistoskopija.

Čeprav rak sečnega mehurja ni pogosta bolezen, pa se pogosto ponavlja. Neinvazijski papilarni urotelijski karcinomi se ponovijo v približno 70 %, v približno 5 % pa napredujejo v invazijski karcinom (7). Poseben klinični problem so bolniki s plitko invazijo karcinoma (v lamino proprijo) ob prvi diagnozi. Pri teh bolnikih karcinom napreduje z vraščanjem v mišični sloj v 20–30 %, kar pomeni širjenje bolezni, ki ogrozi bolnikovo življenje (25), zato bolnike kliniki urologi redno spremljajo. Citopatološka preiskava urina in izpirka iz sečnega



Slika 7a. FISH negativen: diploidni celici (normalno število kopij kromosomov 3, 7, 17, 9p21).



Slika 7b. FISH pozitiven: aneuploidna (maligna) celica (pomnoženo število kopij kromosomov 3, 7, 17, 9p21).



mehurja z dodatnimi metodami ostaja ob cistoskopiji in slikovnodiagnostičnih preiskavah pomembna diagnostična metoda za odkrivanje ponovitev bolezni.

Če poznamo prednosti in omejitve citopatološke preiskave urina in izpirkov iz sečnega mehurja, bo ta kot prva diagnostična

metoda pri bolnikih s simptomi prispevala k nadaljnjim namenskim diagnostičnim postopkom, pri bolnikih po zdravljenju pa k hitrejšim ukrepom pri ponovitvah bolezni. Upamo pa tudi, da nam bo novi test *UroVysion* pomagal izboljšati neinvazivno diagnostiko urotelijskega karcinoma (sliki 7a in 7b).

## LITERATURA

1. Koss LG. Tumors of the urinary tract in urine and brushings. In: Koss LG, Melamed MR, eds. *Koss's diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 777-846.
2. Koss LG. The lower urinary tract in the absence of cancer. In: Koss LG, Melamed MR, eds. *Koss's diagnostic cytology and its histopathologic bases*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 738-76.
3. Rosenthal DL, Raab SS. Cytologic detection of urothelial lesions. In: Rosenthal DL, ed. *Essentials in cytopathology series*. New York (NY): Springer; 2005. p. 57-62.
4. Bratuš D, ed. Seminar o nujnih stanjih v urologiji. Zbornik predavanj; 2004 May 21; Maribor.
5. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS Jr, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: The American Urological Association best practice policy – part I: definition, detection, prevalence, and etiology. *Urology*. 2001; 57: 599-603.
6. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS Jr, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy – part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up. *Urology*. 2001; 57: 604-10.
7. Greene LF, Hanash KA, Farrow GM. Benign papilloma or papillary carcinoma of the bladder? *J Urol*. 1973; 110: 205-7.
8. Grunze H, Springss AL. History of clinical cytology. A selection of documents. Darmstadt: G-I-T Verlag Ernst Giebler; 1980.
9. Lopes-Beltran A, Sauter G, Gasser T, et al. Infiltrating urothelial carcinoma. In: WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; Oxford: Oxford University Press (distributor); 2004. p. 93-109.
10. Curry JL, Wojcik EM. The effect of the current World Health Organisation/International society of urologic pathologists bladder neoplasm classification system on urine cytology results. *Cancer*. 2002; 96: 140-5.
11. Sauter G, Algaba F, Amin MB, et al. Non-invasive urothelial tumors. In: WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; Oxford: Oxford University Press (distributor); 2004. p. 110-9.
12. Strojjan Fležar M. Osnove diagnostične citopatologije. *Med Razgl*. 2008; 47: 87-95.
13. The ThipPrep Pap Test. The most trusted pap test for your cervical health concerns [internet]. Bedford (MA): Hologic™; c2009 [citirano 2009 Apr 2]. Dosegljivo na: <http://www.thinprep.com/>
14. BD SurePath™ liquid-based Pap test [internet]. Franklin Lakes (NJ): Becton, Dickinson and Company; c2010 [citirano 2009 Apr 2]. Dosegljivo na: <http://www.bd.com/tripath/physicians/surepath.asp>
15. Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP, et al. The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer Cytopathol*. 1999; 87: 118-28.
16. Ross JS, Cohen MB. Ancillary methods for the detection of recurrent urothelial neoplasia. *Cancer*. 2000; 90: 75-86.
17. Us-Krašovec M. Pretočna in slikovna citometrija – novi kvantitativni metodi. *Onkologija*. 1998; 2: 40-2.
18. Urovysion.com [internet]. Downers Grove: Abbott Laboratories; c2009 [citirano 2009 Apr 2]. Dosegljivo na: <http://www.urovysion.com/>
19. Böcking A, Striepecke E, Auer H, et al. Static DNA cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. In: Wied GL, Bartels PH, Rosenthal D, eds. *Compendium on computerized cytology and histology laboratory*. Chicago: Tutorials of cytology; 1994. p. 107-28.
20. Strojjan Fležar M, Us Krašovec M. Slikovna citometrija v onkologiji. *Med Razgl*. 2002; 41: 313-20.
21. Tribukait B. Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms. *World J Urol*. 1987; 5: 108-22.
22. Halling KC, Kipp BR. Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology. *Hum Pathol*. 2007; 38: 1137-44.
23. Richter J, Beffa L, Wagner U, et al. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*. 1998; 153: 161-21.

24. Zhao J, Richter J, Wagner U, et al. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). *Cancer Res.* 1999; 59 (18): 4658–61.
25. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, et al. Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol.* 2001; 116: 79–86.
26. Schmitt FC, Longatto-Filho A, Valent A, et al. Molecular techniques in cytopathology practice. *J Clin Pathol.* 2008; 61: 258–67.
27. Kipp BR, Tanasescu M, Else TA, et al. Quantitative fluorescent in situ hybridisation and its ability to predict bladder cancer recurrence and progression to muscle invasive bladder cancer. *J Mol Diagn.* 2009; 11 (2): 148–54.
28. Cancer Registry of Slovenia. *Cancer Incidence in Slovenia 2005.* Report No. 47. Ljubljana: Institute of Oncology; 2008.

Prispelo 3. 4. 2009



Tatjana Pokrajac<sup>1</sup>

# Bioterrorizem

## *Bioterrorism*

---

### IZVLEČEK

---

**KLJUČNE BESEDE:** bioterizem, biološko orožje

Bioterrorizem je ogrožanje zdravja prebivalstva z umetno povzročeni epidemijami bakterijskih nalezljivih bolezni, kot so antraks, kuga, kolera, tularemija, bruceloza, botulizem, z nekaterimi virusnimi povzročitelji, kot so virus črnih koz, virusi hemoragične vročice (ebola, marburg, lassa in machupo), z rikeciziami ali s sistemskimi mikozi. Članek zajema analizo mikrobioloških povzročiteljev, ki so zanimivi za bioterizem, ter možnosti zagotavljanja učinkovitega preventivnega ukrepanja (preventivni ukrepi v okviru varovanja javnega zdravja, cepljenja, zakonski predpisi o varovanju javnega zdravja in pripravljenosti na bioterizem) in ukrepanja, ko do bioterističnih akcij pride: vključitev zdravstvenega sektorja – epidemiologov, infektologov in mikrobiologov, vseh sil zaščite (enote in službe društev ter drugih nevladnih organizacij), gospodarskih družb, zavodov, organizacij, enot, službe in organov civilne zaščite, policije, slovenske vojske. Namen prispevka je oceniti ogroženost zaradi bioterizma in na podlagi ocene ogroženosti, razpoložljivih sil in sredstev za zaščito predlagati zaščito, reševanje in pomoč.

---

### ABSTRACT

---

**KEY WORDS:** bioterism, biological warfare

Bioterrorism is an attack on the health of the general population through an artificially induced epidemic of bacterial infectious diseases such as anthrax, plague, cholera, tularemia, brucellosis or botulism, and certain viroses, such as Ebola, smallpox etc., along with rickettsioses or systemic mycoses. This article includes an analysis of microbiological agents which are of interest for bioterrorism and the possibility of providing efficient preventative action (e.g. preventative measures in the context of public health protection, vaccination, legal regulations on the public health protection and preparedness for bioterrorism) and measures in the case bioterrorism actually occurs (e.g. inclusion of the health sector, in particular epidemiologists, infectious disease specialists, and microbiologists, as well as all defense forces, such as units and service of associations and other NGOs, along with commercial companies, institutes and other organisations, and units, services of Civil Defense, Police and the Slovenian Army. The purpose of the study was to assess the threat of bioterrorism and to propose protection, rescue and assistance on the basis of risk assessment, the available forces and resources.

---

<sup>1</sup> Asist. dr. Tatjana Pokrajac, dr. med., Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, Trubarjeva 2, 1000 Ljubljana; tatjana.pokrajac@ivz-rs.si

## UVOD

Terorizem je metoda delovanja, ki uporablja ustrahovanje, grožnje in nasilje. Dejansko gre za politično orožje oz. politično delovanje. Pri bioterorizmu gre večinoma za vnašanje bolezni na območje, ki ga obvladuje nasprotnik, ali pa za napad s povzročitelji bolezni na specifične tarče s posebnim strateškim ali velikim družbenim pomenom (1, 2). Biološko orožje uvrščamo med orožja za množično uničenje. Gre za bistveno cenejše orožje od jedrskega ali celo kemičnega. Računajo, da bi večji napad z biološkim orožjem stal vsaj milijon dolarjev (3). Tovrstni napad lahko povzroči takojšnja neposredna škoda (npr. približno 30 % obolelih za črnimi kozami umre), vsesplošno paniko in hude kasnejše posledice (3, 4). Ameriški akademiki so na podlagi simuliranega napada z virusom črnih koz izračunali, da bi lahko v dveh tednih po napadu na sodobno družbeno okolje umrlo 2500 ljudi (1). Pred

takim napadom se je mogoče zaščititi s cepljenjem ogrožene populacije (1).

## RAZVRSTITEV BIOLOŠKIH AGENSOV

Posamezne mikrobiološke povzročitelje, ki so zanimivi za bioterorizem, razvrščamo v tri kategorije.

Kategorija A zajema povzročitelje, ki visoko ogrožajo nacionalno varnost, se z lahkoto razširijo ali prenesejo s človeka na človeka, povzročajo veliko umrljivost, imajo velik vpliv na javno zdravje, lahko povzročajo paniko med prebivalstvom, imajo velik socialni vpliv ter zahtevajo posebne aktivnosti na področju pripravljenosti. Drugi visoko rizični povzročitelji so tisti, ki se razmeroma lahko razširjajo, povzročajo zmerno obolevnost in nizko umrljivost, zahtevajo specifične diagnostične metode in okrepijo epidemiološko spremljanje (kategorija B). V kategoriji C spadajo tisti

Tabela 1. Posamezni mikrobiološki povzročitelji in bolezni, ki jih le-ti povzročajo, razvrščeni v tri kategorije (7).

Kategorija	Povzročitelj	Bolezen
A	<i>Bacillus anthracis</i>	Antraks
	<i>Clostridium botulinum</i> toksin	Botulizem
	<i>Yersinia pestis</i>	Kuga
	<i>Variola major</i>	Koze
	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemija
	Virusi hemoragične vročice (ebola, marburg, lassa, machupo)	Hemoragična vročica
	B	<i>Brucella</i> spp.
<i>Clostridium perfringens</i>		Plinska gangrena in zastrupitev s hrano
<i>Salmonela</i> spp.		Salmoneloza
<i>Escherichia coli</i> O157:H7		Driska, hemolitični uremični sindrom
<i>Shigella</i>		Šigelozna
<i>Burkholderia mallei</i>		Smrkavost
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		Melioidoza
<i>Chlamydia psittaci</i>		Psitakoza
<i>Coxiella burnetii</i>		Vročica Q
Stafilokokni enterotoksin B		Zastrupitev s hrano
<i>Rickettsia prowazekii</i>		Pegavica
Alfavirusi (venezuelski, vzhodni in zahodni konjski encefalitis)		Virusni encefalitis
<i>Vibrio cholerae</i>		Kolera
<i>Cryptosporidium parvum</i>		Kriptosporidioza
C	<i>Virus Nipah</i>	Virusni encefalitis
	<i>Hantavirus</i>	Hemoragična vročica z renalnim sindromom

povzročitelji, ki so zlahka dosegljivi, se jih lahko enostavno izdela in razširja, povzročajo veliko obolevnost, umrljivost in imajo ogromen vpliv na zdravje (5–7). V tabeli 1 so posamezni mikrobiološki povzročitelji in bolezni, ki jih le-ti povzročajo, razvrščeni v tri kategorije.

## POVZROČITELJI

### ***Bacillus anthracis***

*Bacillus anthracis* je prvi izoliral in opisal Robert Koch že leta 1867. *B. anthracis* je po Gramu pozitivna bakterija, in sicer so to 1 µm široki in 3–5 µm dolgi bacili. Celice te fakultativno anaerobne bakterije so negibljive, kapsulirane in tvorijo kratke verižice. Včasih imajo centralno ležečo sporo, kadar je prisoten kisik, če bakterija raste v kulturi ali zemlji. Spore ne nastanejo v krvi ali tkivu živali. *B. anthracis* raste pri 37 °C na krvnem agarju v velikih kolonijah velikosti 2–5 mm, brez hemolize. Ker imajo kolonije nazobčan rob, so jih primerjali z meduzino glavo. Bacil tvori katalazo, reducira nitrate in je občutljiv za penicilin. Polipeptidna kapsula je glavni virulentni dejavnik. *B. anthracis* izloča toksin, ki je sestavljen iz treh proteinov in po sestavi sodi med toksine A-B. Skupno delovanje vseh treh proteinov, ki sestavljajo antraksov toksin, povzroči močan edem in nekrozo tkiva (6, 8).

Bakterijo identificiramo pod mikroskopom z barvanjem po Gramu, na krvnem agarju prepoznamo kolonije, tvorjenje spor na zraku in gibljivost. Identifikacijo lahko potrdimo s specifičnimi protitelesi z metodo neposredne imunofluorescence. Okužbo z *B. anthracis* moramo prijaviti najbližjemu referenčnemu mikrobiološkemu laboratoriju, da okužbo potrdi (6).

Okužba se pri ljudeh razvije na tri načine, odvisno od poti vstopa bacilov v telo. Najpogostejša je kožna oblika. Pojavi se največkrat drugi ali tretji dan po okužbi, navadno na rokah, kjer bacili vstopijo skozi kožne ranice. Kaže se kot neboleča, mozolju podobna pustula, ki se lahko hitro širi. V njeni okolici lahko nastane več majhnih mehurčkov s seroznim izcedkom. Pustula je rdeča, ima črnkasto sredino, njena okolica pa je močno otečena. V 70–80 % se lezije zacelijo spontano, brez zdravljenja (6). Pljučna oblika nastane pri vdihavanju spor. Inkubacijska doba

pljučne oblike antraksa je od 2–43 dni (po opazovanju v Sverdlovskem – epidemija antraksa, ki je izbruhnila v okolici sovjetske vojaške tovarne za biološko orožje v Sverdlovskem leta 1979), večina primerov zbolí v 1 do 2 tednov po okužbi (3, 8). Črevesna oblika je redka in se pojavi po zaužitju mesa bolne živali. Bolnik bljuva, ima drisko, iztrebkom je primešana sveža kri. Bolezen se stopnjuje v šok in smrt. Bakteriemijska z *B. anthracis* nastane v vseh treh oblikah humanega antraksa in je vedno smrtna (6, 8). Umre 85 % bolnikov, ki jih ne zdravimo. Odstotek in stopnja smrtnosti sta velika, kadar začnejo bolnike zdraviti več kot 48 ur po začetku bolezni (3).

Za zdravljenje kožnega antraksa se uporabljata penicilina G in V, vendar se pojavlja vse več rezistentnih sevov. Kot drugo zdravilo izbora uporabimo eritromicin, ciprofloksacin ali vankomicin. Zdravljenje vključuje tudi pasivno imunizacijo s toksinom antraksa. Pri izpostavljenosti sporam *B. anthracis* je priporočena 60-dnevna preventivna antibiotična zaščita s ciprofloksacinom ali doksiciklinom (6, 8).

### ***Clostridium botulinum***

Bacili *C. botulinum* so po Gramu pozitivni spirogeni anaerobi. Spora leži subterminalno. Bacili spominjajo na teniški lopar. V anaerobnih razmerah na krvnem agarju zrastejo bacili v dveh dneh kot prozorne kolonije, ki jih obdaja rahla hemoliza beta. Trdoživost spor je odvisna od okolja. V kislem mediju slabo preživijo, pri pH 3,7 jih uniči že 10-minutno segrevanje pri 80 °C, medtem ko jih pri višjem pH (pH = 7) uniči šele segrevanje nad 100 °C, in to v 5,5 ure. Skupaj z nekaterimi drugimi klostridiji, kot so *C. butyricum*, *C. baratti* in *C. argentinense*, vsebujejo sedem nevrotoksinov, poimenovanih od A do G. Tipi A, B, E in F so poznani kot človeški tipi, ki povzročajo klinične sindrome, to so s hrano povzročeni botulizem (intoksikacija), kožni botulizem (okužba in produkcija toksina) in botulizem, povzročen po kolonizaciji v črevesju pri dojenčkih (botulizem pri dojenčkih), pri starejših otrocih in odraslih. Toksin botulizma se po krvi raznese vse do živčno-mišičnega stika, kjer inhibira izločanje acetilholina (6, 8). Posledice so akutne ohlapne paralize, ki se začnejo na glavi in se razširijo po telesu (3).

Klinična slika je odvisna od človekove starosti in količine toksina, ki pride po krvi do živčevja. Inkubacijska doba je od 12–72 ur, lahko pa variira od dveh ur do osem dni, odvisno od inokulacije (9). Na klasičen botulizem moramo posumiti, kadar ima bolnik težave z vidom (dvojen in nejasen). Zgodnji znak je stopnjujoča se splošna slabost, v 18–24 urah po zaužitju že nastanejo težave z vidom in požiranjem, popusti mišični tonus, kar lahko vodi do prekinitve dihanja in srčnega zastoja. Pri odraslem bolniku dokazujemo toksin v serumu. Bacil *C. botulinum* dokazujemo v kulturi iz sumljivega živila, ki ga je bolnik zaužil, in v iztrebkih otrok, zbolelih za botulizmom. Sumljive so tudi osebe, ki so zaužile enako hrano kot bolniki, pri katerih je bil botulizem že dokazan. Specifični toksin v preiskovanem vzorcu oz. izoliranem sevu dokazemo z nevtralizacijskim poskusom na miših. Zdravljenje z antitoksinom se začne takoj, ko se postavi diagnoza. Proti hujšim zastrupitvam je na voljo konjski hiperimuni serum, ki vsebuje trivalentni antitoksin proti tipom A, B in E. Diagnozo botulizem lahko postavijo samo posebej opremljeni mikrobiološki laboratoriji (6, 8).

### ***Yersinia pestis***

*Yersinia pestis* je član družine enterobakterij. Bakterija je za oksidazo negativen fakultativni anaerob, ki se po Gramu barva negativno, po Giemsi pa bipolarno. Bakterija je negibljiva in nima spor. Optimalno raste na temperaturi 28–30 °C, za rast pa potrebuje železo. Je zelo odporna bakterija, saj preživi več tednov v izločkih okuženih ljudi in glodalcev ter v prsti. Vzorec, ki ga dobimo z direktnim brisom iz okuženega materiala, barvamo po Gramu, Giemsi in Wrightu. Sumljivi so bipolarno obarvani bacili. Verjetno diagnozo postavimo, kadar je pozitiven neposredni imunofluorescenčni test. Za potrditev diagnoze je potrebna tudi osamitev mikroba. Kolonije, ki jih gojimo na krvnem agarju ali na posebnih obogatenih gojiščih, so po 24 urah pri 35 °C pikčaste in se pozneje povečajo. Po nekaj dneh kolonije na gojišču dobijo obliko »jajca, pečenege na oko«. Bakterijo dokončno identificiramo z biokemičnimi testi (8).

*Y. pestis* izoliramo iz krvi, sputuma in aspirata limfnih žlez. Okužba z *Y. pestis* je zoono-

za (zoonoze so nalezljive bolezni, ki se z živali prenašajo na človeka, živali predstavljajo rezervoar okužbe in človek je navadno le naključni gostitelj). Bubonsko kugo prenašajo na človeka podgane preko podganjih bolh. Bacil se pozneje širi z bolnikov z buboni (gnojnimi bezgavkami) na zdrave ljudi kot pljučna kuga, ki je vedno smrtna (6).

Pri človeku se bolezen pojavlja v treh kliničnih oblikah: bubonska, pljučna in septikemična (prisotnost patogenih mikroorganizmov in njihovih toksinov v krvi) kuga. Prevladuje bubonska kuga, pri kateri bakterije prodrejo v področne bezgavke, nato v kri in organe. Bolezenski znaki nastopijo 2–4 dni po ugrizu bolhe (vročina, glavobol, slabost, bruhanje in driska). Za bubonsko kugo so najznačilnejše močno povečane in boleče bezgavke (buboni), za pljučno obliko kašelj in dispneja, sepsa pa poteka kot naglo razvijajoči se endotoksični šok. Pri pljučni obliki se jersinije lahko širijo neposredno s človeka na človeka s kašljem. Nezdravljeni bolniki umrejo v nekaj dneh po začetku bolezenskih znakov (8).

Zdravljenje je učinkovito z gentamicinom, streptomycinom in doksiciklinom. Ob pravem zdravljenju se smrtnost zmanjša za približno 50 % (6).

Epidemij urbane kuge ni več, čeprav ne vemo natančno, zakaj. Kuga je po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) še vedno pomembna v Afriki, Aziji in Južni Ameriki. Prva cepiva iz inaktiviranih bacilov *Y. pestis* so preizkusili že konec 19. stoletja. Danes več farmacevtskih družb izdeluje inaktivirana cepiva proti kugi. Izdelovalci uporabljajo virulenten sev bacila 195P. Uspeli so tudi oslabiti bacile kuge in pripraviti živo cepivo proti kugi iz oslabljenega seva EC76, toda danes tega cepiva ni več na trgu. Cepivo je koristno za laboratorijske delavce, ki imajo neposredno opraviti z bacili kuge. Treba je cepiti tudi vojaško osebje na področjih, kjer so bolniki s kugo. Podobno velja tudi za kmetijske strokovnjake in terenske delavce, ki so pogosteje izpostavljeni okužbi zaradi endemične kuge (8, 10).

### **Virus variole**

Virus variole prištevamo v družino poksivirusov. So pravokotni, podobni briketom, dolgi

220–450 nm in široki 140–260 nm. Sestavljajo jih večslojne ovojnice, ki obdajajo sredico in stranski telesci. Genom je linearna molekula dvovijačne DNK, ki ima povezane konce vijačnic. Za dokazovanje črnih koz so že nekdanj uporabljali oplojena kokošja jajca, na katerih virus črnih koz povzroča značilne nekroze na horioalantoični ovojnici ploda. Z imunološkimi tehnikami prepoznamo najmanj sedem antigenov in 17 polipeptidnih verig. Diagnozo črnih koz postavimo z barvanjem preparata po Giemsi, kjer v epiteljskih celicah vidimo citoplazemske eozinofilne vključke (Guanierijeve inkluzije). Virus črnih koz kultiviramo v mnogih tkivih različnih živali. Človeške embrionalne celice ali opičje ledvične celice so za kultivacijo najprimernejše. Citopatološki efekt se razvije v 5–8 dneh, s citoplazemskimi eozinofilnimi vključki (Guanierijeve inkluzije), ki so vidni po 48 urah. Laboratorijsko diagnozo črnih koz lahko postavimo s svetlobno mikroskopijo (Guanierijeve telesca), z elektronsko mikroskopijo (virioni v postružkih vzorcev kožnih mehurčkov), z gel difuzijskim testom (ne ločuje virusov variola, vaccinia, cowpox ali monkeypox) in z identifikacijo po karakteristični rasti v celični kulturi (horioalantoična membrana), kjer variolo nakazujejo majhne, sivo-bele pege. Sicer pa se danes najučinkoviteje diagnosticira virus črnih koz z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Izolacijo virusa lahko izvaja samo poseben P4-laboratorij (6, 11–13).

Virus črnih koz je zelo nalezljiv in virulenten, pri necepljenih osebah je smrtnost 30%. Virus variole predstavljata dva seva: *Variola major*, ki povzroča črne kože, in *Variola minor*, ki povzroča milejšo obliko črnih koz. Okužba se širi s kapljično inhalacijo virusnih delcev. Virus se replicira v mukoznih celicah zgornjega respiratornega trakta in v regionalnih limfnih žlezah. Predhodna viremija vodi do toksične faze bolezni. Klinično v tej fazi nastanejo prodromalni izpuščaji, pride do porasta telesne temperature (40 °C), glavobola, bolečine, občutka slabosti in onemoglosti. Inkubacija traja 12–14 dni (variora od 7–17 dni) (9). V 3–4 dneh nastanejo lezije kože in sluznic, ki se z jezika in neba širijo na obraz in roke (v tem obdobju so bolniki zelo kužni) in nato na noge in telo. Kožne lezije se kažejo kot makule, papule, vezikule in

pustule. Pustule postanejo hemoragične in zlite. Brazgotine nastanejo kot rezultat praskanja. Notranji organi se spremenijo z maščobno degeneracijo in fokalno nekrozo. Biopsija kožnih lezij pokaže eozinofilne kožne inkluzije, obkrožene s halojem, kolobarjem. Diferencialnodiaagnostično moramo izključiti okužbo s poksivirusom. Če bolnik preživi okužbo s črnimi kozami, ostanejo v obtoku protitelesa še 20 let in bolnik je zaščiten do smrti. Človek je edini naravni gostitelj virusa črnih koz, okužba se širi z osebe na osebe. Med inkubacijo in v prodromalnem stadiju je virus težko spoznati. Bolezen je bolj prepoznavna ob erupciji kožnih lezij v stadiju aktivne bolezni. Najpogosteje se prenaša iz respiratornega trakta z aerosolom, lahko pa s kontaminirano hrano in pijačo. Kožne lezije lahko kontaminirajo posteljo, obleko ali knjige. Antivirusna zdravila za zdravljenje črnih koz se razlikujejo, do sedaj še ni dokazov o uspešnem antivirusnem zdravljenju. Virus črnih koz in njihovi antigeni so zelo stabilni, vzorec za identifikacijo vzamemo iz krvi, postrgane kože, sline, kožnih pustul in krast. Če identificiramo virus črnih koz, moramo takoj obvestiti pristojno epidemiološko službo (6, 13).

Virus črnih koz ostane pri sobni temperaturi kužen približno leto dni, pri temperaturi 4 °C več mesecev in pri temperaturi od –20 do –70 °C več let. Pomembna je dekontaminacija bolnikovih oblačil, perila in pohištva. Mnoga razkužila so nezadostno učinkovita. Inaktivacijo dosežemo z lipofilnimi topili (kloroform) in sredstvi, ki vsebujejo amoniak. Viruse črnih koz uničimo z avtoklaviranjem ter z vročino, in sicer pri temperaturi 60 °C potrebujemo 10 minut. V času, ko virus črnih koz ni bil eradican, smo cepili primarno dojenčke in revakcinirali otroke, preden so šli v šolo oz. v primeru izpostavljenosti virusu. V primeru epidemije črnih koz se priporoča izolacija bolnika in masovno cepljenje prizadete populacije. SZO mora biti obveščena o epidemiji črnih koz v državah in omejiti potovanje in transport. S cepljenjem s standardno vakcino vzpostavimo imunost v sedmih do desetih dneh. Vakcinacija pri ljudeh, ki so že bili izpostavljeni virusu črnih koz, je uspešna, če cepimo 3–4 dni po izpostavljenosti virusu. Cepljenje peti dan po okužbi ublaži klinično sliko. Preventivna zaščita traja od



3–7 let, če se cepimo vsake tri leta, smo zaščiteni popolno (100%). Cepivo proti črnim kozam je vprašljivo zaradi mnogih stranskih učinkov (6, 10). Z 11. septembrom 2001 se je začel razvoj cepiva Acam2000. Gre za gojenje virusa v Vero celičnih kulturah (celice ledvic afriške zelene opice). Dokazali so, da je telo preiskovancev v visokem odstotku sprejelo cepivo (14). Redko so prisotni stranski učinki, toda opisujejo tudi smrtne primere (15). Novo izdelano cepivo je modificirana vakcina Ankara (MVA), ki temelji na rekombinantnem virusu. Podatki kažejo, da bi bilo mogoče to cepivo uporabljati pri imunsko oslabljenih bolnikih (14).

### Agensi, ki povzročajo hemoragično vročico

Sindrom virusne hemoragične vročice povzročajo različne skupine virusov. To so RNK-virusi, člani družine *Filoviridae* (virusa ebola in marburg), *Arenaviridae* (vročica lassa, argentinski, bolivijski, venezuelski in brazilski virusi hemoragične vročice), *Bunyaviridae* (hanta virus, vročica Rift Valley in virus kongo-krimške hemoragične vročice). Človek se okuži, če pride v stik z okuženimi živalmi, preko členonožcev in od drugih bolnih ljudi. Inkubacijska doba je različno dolga (6). Ljudje, ki zbolijo zaradi omenjene skupine virusov, imajo predvsem težave z ožiljem, sicer pa je prisotna tudi povišana telesna temperatura, bolečine v mišicah, oslabelost in nastanek spontanih krvavitev v sluznicah. Bolniki so pogosto šokirani. Ti virusi kažejo visoko obolevnost in smrtnost. Zdravljenje vključuje predvsem podporne ukrepe, antiviralno zdravilo ribavarin pa je učinkovito pri naslednjih virusih: virus, ki povzroča vročico lassa, argentinsko, bolivijsko in kongo-krimsko hemoragično vročico ter vročico Rift Valley. Diagnozo virusov, ki povzročajo hemoragično vročico, lahko postavijo le redki laboratoriji. Dokažemo jih s kulturo, s serološkimi in imunohistološkimi testi ter z metodo pomnoževanja nukleinskih kislin. Zdravniki ali medicinske sestre, ki so v stiku z bolnikom in kužnino, se morajo primerno zaščititi. Laboratorijski delavci in kurirji, ki te kužnine prenašajo, morajo tudi biti primerno zaščiteni. Takoj, ko se pojavi hemoragična vročica, je treba obve-

stiti in prijaviti bolezen najbližjemu epidemio-  
loškemu centru (6).

### **Francisella tularensis**

*Franciselle* so drobni, po Gramu negativni bacili, ki so zahtevni za rast, gibljivi, ne delajo spor in so strogo aerobni. Sintetizirajo številne encime, ne pa ureaze. V skupini poznamo več vrst. Za človeka je *Francisella tularensis* najbolj virulentna bakterija med bakterijami tega rodu. Kolonije so na agarju z dodatkom cisteina po 48 urah ob 35 °C silno drobne, opalescentne (spreminjajo barvo kakor opal) in zelenkaste. Še drobnejše so kolonije na navadnem ali čokoladnem agarju. *Franciselle* navadno gojijo v loncu z dodatkom CO<sub>2</sub> (8).

Ob sumu na *F. tularensis* moramo seve takoj poslati v najbližji referenčni laboratorij, da se jih dokončno identificira. Naravni rezervoarji *F. tularensis* so glodalci in druge živali. Človek se okuži z neposrednim dotikom živali ali redkeje preko vektorjev, ki so klopi, muhe in komarji. Človek se okuži s kožno inokulacijo, z inhalacijo ali ingestijo. Okužbo s *F. tularensis* klasificiramo kot ulceroglandularno, glandularno, okuloglandularno, faringealno, tifoidalno in pljučno. Pljučna oblika tularemije je opisana s simptomi atipične pljučnice, kašljem, izmečkom, bolečino v prsih (zaradi plevritisa) in povišano telesno temperaturo. Vzorci za izolacijo *F. tularensis* se vzamejo iz krvi, plevralne tekočine, sputuma, limfnih žlez, ran in želodčnega izpirka. Diagnozo ponavadi postavimo s serološkimi testi oz. navzkrižnimi reakcijami z *Brucella* spp., *Proteus OX19* in *Yersinia* spp. Tularemijo zdravimo s streptomycinom in gentamicinom. Zdravljenje s kloramfenikolom in tetraciklinom ni popolno, pojavijo se ponovni zagoni bolezni. Cepivo proti *F. tularensis* še raziskujejo (6).

### KAKO RAVNATI OB BIOTERORISTIČNEM DOGODKU

Od oktobra 2001, ko so ZDA doživele napad z biološkim orožjem (antraksom), se je bojažen pred potencialnim napadom razširila tudi v zavezniške države oz. članice zveze NATO. V svetu si prizadevajo, da bi koordinacija obvladovanja nasilja z biološkim orožjem potekala na globalni ravni, enako kot

nevarnost, ki ga za ves svet predstavlja uporaba biološkega orožja. Že Ženevski protokol iz leta 1925 je narekoval splošno odklonilno mnenje civiliziranih človeških družb oz. obsojal tovrstno uporabo mikroorganizmov (2).

Razprave o biološki vojni skoraj vedno načenjajo vprašanje, kako načrtovati varovalne ukrepe, kako jih usklajevati in kaj storiti, da bi bili pripravljeni na bioteroristični napad. Vprašanje že nekaj let vznemirja patologe, epidemiologe, infektologe, mikrobiologe, zdravnike preventivne medicine, zaposlene v javnem zdravju, in farmacevte (3, 16, 17). Glede na notranje in zunanje potencialne sovražnike naj bi države izdelale lastne ocene tveganja zaradi bioloških agensov in glede na ranljivost ter ogroženost populacije sprejele ustrezne zaščitne ukrepe (5). Nekatere ukrepe pa moramo sprejeti in se moramo pripraviti ne glede na to, ali je razširjanje bioloških agensov namerno ali pa nenamerno (18).

V Sloveniji sistem spremljanja in nadzora nalezljivih boleznih predstavlja pomemben del javnega zdravja. Je sestavni del programa Centra za nalezljive bolezni Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije in mreže območnih Zavodov za zdravstveno varstvo, povezanih v nedeljivo celoto za epidemiološko spremljanje in obvladovanje nalezljivih boleznih. Na regionalnem nivoju se izvajajo intervencije pri zbolelih, osebah, ki so obolelemu blizu, njegovi okolici, v splošni populaciji ter drugi ukrepi, skladno z doktrino obvladovanja nalezljivih boleznih in zakonodajo (5).

Izvršba zakona igra pomembno vlogo v vrednotenju in preiskovanju aktivnosti zaradi bioterorizma ali biokriminala (19, 20). Poglavitni predpisi, ki urejajo področje nalezljivih boleznih v Republiki Sloveniji, so: Zakon o nalezljivih boleznih, Pravilnik o prijavi nalezljivih boleznih in posebnih ukrepih za njihovo preprečevanje in obvladovanje, Pravilnik o cepljenju, zaščiti z zdravili in varstvu pred vnosom in razširjanjem nalezljivih boleznih, Program imunoprofilakse (uporabe cepiv ali imunoglobulinov za zaščito sprejemljivih oseb proti določeni bolezni) in kemoprofilakse (preprečevanje okužb z zdravili), Pravilnik o pogojih za pripravo in izvajanje programa preprečevanja in obvladovanja bolnišničnih okužb, Zakon o veterinarstvu ter vrsta pred-

pisov, ki jih je sprejel Evropski parlament in Mednarodni zdravstveni pravilnik Svetovne zdravstvene organizacije (2, 3). Na področju kemijske varnosti se oblikujejo predpisi, ki bodo med drugim urejali tudi nadzor strateškega blaga posebnega varnostnega pomena, kot so tudi biološki agensi. Na področju varstva pred vnosom in razširjanjem nalezljivih boleznih v povezavi z mednarodnim pretokom ljudi, blaga in prometnih sredstev je bil leta 2005 sprejet nov mednarodni zdravstveni pravilnik. Na podlagi Zakona o varstvu pred naravnimi in drugimi nesrečami je izdelan načrt zaščite in reševanja ob množičnem pojavu kužnih boleznih pri živalih in v pripravi je še načrt ob pojavu bolezni pri ljudeh (5).

Poleg z zakonom predpisanega spremljanja nalezljivih boleznih se izvajajo številna preučevanja, ki poglobljujejo prispevajo k poznavanju epidemioloških vzorcev in bremena nalezljivih boleznih in njihovih povzročiteljev. Za posamezne bolezni se pridobivajo še dodatni podatki o umrlih in sprejetih v bolnišnico (5).

Na področju Evropske skupnosti je vzpostavljen sistem zgodnjega zaznavanja, obveščanja in naglega ukrepanja med 25 državami. S kontaktno točko na državnem nivoju je identificiran sprejemnik in obenem vir informacij za dogodke oziroma stanja (5).

Program pripravljenosti in odgovora zdravstvenega sektorja na bioteroristične napade v sodobnem času sloni na spremljanju gibanja nalezljivih boleznih in zgodnjem zaznavanju nenavadnih kliničnih potekov oz. kopičenju primerov bolezni, preučevanju izbruhov in epidemij nalezljivih boleznih, hitri mikrobiološki diagnostiki, sodelovanju posameznih služb in dejavnosti znotraj zdravstva ter, širše, načrtovanju programov ukrepanja, ocenjevanju pripravljenosti ob rednem izobraževanju kadrov, ustvarjanju zaloga zdravil, namenjenih za kemoprofilakso in zdravljenje obolelih, nabavi oz. poznavanju proizvajalcev antitoksinov (protitelo proti bakterijskemu toksinu ali antiserum, ki vsebuje taka protitelesa) in cepiv ter takojšnji prijavi primerov nalezljivih boleznih epidemiološki službi (3, 21). Na področju varstva prebivalstva zaradi možnosti namernega ali nenamernega razširjanja bioloških agensov je na nacionalnem nivoju z vidika zdravstvene dimen-

zije izdelan osnutek načrta pripravljenosti na koze, antraks in sindrom akutne respiratorne stiske (SARS) (5).

V primeru terorističnega dogodka se morajo vsi mikrobiološki laboratoriji nemudoma odzvati. Mikrobiološki in kemični vpogled v biološke agense je eden glavnih orodij za prepoznavanje bioterorizma (9). Bioznost je na tem področju dobila nove razsežnosti (22, 23). V ZDA Vojaški inštitut za medicinske raziskave infekcijskih bolezni (*US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases* – USAMRIID), Ameriški center za nadzor nad nalezljivimi boleznimi (*Center for Disease Control and Prevention* – CDC), Ameriški zvezni urad za hrano in zdravila (*Food and Drug Administration* – FDA) ter Organizacija biotehnoške industrije (*Biotechnology Industry Organization* – BIO) in tudi privatni sektor raziskujejo bioterorizem in uporabljajo vrhunsko tehnologijo za proizvodnjo zdravil in cepiv. Odkrivajo nove antibiotike, antiviralna zdravila in nova cepiva, kot je cepivo proti črnim kozam (24–26).

Pripravljenost na bioterorizem tudi veliko stane. Od leta 2002 do leta 2005 je CDC za pripravljenost na bioterorizem porabil med 1,4 in 1,7 milijard dolarjev, to je 22% celotnega CDC-proračuna. Leta 2001 pa so morali zaradi incidenta z antraksom temu znesku dodati še 0,6 milijard dolarjev (27). Opozar-

jajo, da je premajhen delež denarja namenjen prav mikrobiološkimi laboratorijem (28).

Vključiti je treba še vse sile zaščite: enote in službe društev ter drugih nevladnih organizacij, gospodarske družbe, zavode, druge organizacije, enote, službe in organe civilne zaščite, policijo in vojsko (29).

## ZAKLJUČEK

Zadnji programi pripravljenosti na bioterorizem nakazujejo iracionalen in nefunkcionalen odziv na neustrezno označena tveganja, kar mora skrbeti vse člane javnozdravstvene skupnosti (29, 30). Epidemiologi so v strahu, ali bodo zdravniki lahko pravočasno obvarovali tisoče ljudi pred bioteroristično katastrofo, kajti danes so prav redki zdravstveni delavci, ki so že kdaj videli bolnika s črnimi kozami ali kugo. Vranični prisad je postal tako redek, da zdravniki nanj niti ne pomislijo. Redki so tudi laboratoriji, ki so sposobni v kratkem prepoznati ali potrditi takšne nalezljive bolezni (31, 32). Ključ za uspešno »biovarnost« je vse večje zavedanje, zgodnje odkrivanje, pospešeno zdravljenje, celostna odgovornost in zmogljivost vlade in akademije, vključiti je treba vsa javna in zasebna sredstva. Borba proti terorizmu se ne konča znotraj meja države. Vse države morajo v medsebojnem sodelovanju preprečiti proizvodnjo in razširjanje biološkega orožja (33).

## LITERATURA

1. Qutaishat SS, Olson JL. Bioterrorism preparedness: The smallpox vaccine debate. *Clin Med Res.* 2003; 1 (2): 85–6.
2. Stantič - Pavlinič M, Šek S. Biološki in kemični terorizem. Ljubljana: Zavod za zdravstveno varstvo; 2002.
3. Likar M. Biološka vojna. Ljubljana: Ministrstvo za obrambo RS, Uprava RS za zaščito in reševanje; 2005.
4. Compton MT, Kotwicki RJ, Kaslow NJ, et al. Incorporating mental health into bioterrorism response planning. *Public Health Rep.* 2005; 120 Suppl 1: 16–9.
5. Kraigher A, Berger T. Zdravstvena dimenzija ogrožanja nacionalne varnosti. *Varstvoslovje.* 2006; 8 (1): 60–71.
6. Kliemann WF, Ruoff KL. Bioterrorism: Implications for the clinical microbiologist. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (2): 364–81.
7. CDC: Centers for Disease Control and Prevention [internet]. Atlanta (USA): CDC: Centers for Disease Control and Prevention; 2009 [citirano 2009 Apr 20]. Dosegljivo na: <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>
8. Gubina M, Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2002.
9. Buehler JW, Berkelman RL, Hartley DM, et al. Syndromic surveillance and bioterrorism – related epidemics. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (10): 1197–204.
10. Likar M. Cepiva danes in jutri. Ljubljana: Založba Arkadija; 2004.
11. Vozelj M. Imunologija. Enciklopedijski priročnik. Ljubljana: DZS; 1996.

12. Petrovec M. Poxvirusi in Hepadnavirusi [internet]. Ljubljana (SLO): Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo; 2009 [citirano 2009 Apr 20]. Dosegljivo na: <http://www.google.si/search?client=firefox-a&rls=org.mozilla%3Aen-US%3Aofficial&channel=s&hl=sl&q=Poxvirusi+in+Hepadna+virusi&meta=&btnG=Iskanje+Google>
13. Koren S, Avšič - Županc T, Drinovec B, et al. Splošna medicinska virologija. Ljubljana: Medicinski razgledi; 1998.
14. Kramarič A. Nova cepiva proti črnim kozam [internet]. Ljubljana (SLO): Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo; 2003 [citirano 2009 Apr 20]. Dosegljivo na: <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=488>
15. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. MMWR. [internet]. Atlanta (USA): CDC: Centers for Disease Control and Prevention; 2009 [citirano 2009 Apr 20]. Dosegljivo na: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5819a5.htm>
16. Medscape Medical News. Pathologists on the frontlines of war against bioterrorism [internet]. New York (USA): Medscape Medical News; 1994 [citirano 2009 Apr 20]. Dosegljivo na: <http://www.medscape.com/viewarticle/411152>
17. Teeter DS. Bioterrorism Preparedness: Answer for the health system pharmacist. *Am J Health-Syst Pharm.* 2002; 59 (10): 928-30.
18. Treadwell TA, Koo D, Kuker K, et al. Epidemiologic clues to bioterrorism. *Public Health Rep.* 2003; 118 (2): 92-8.
19. Budowle B, Beaudry JA, Barnaby NG, et al. Role of law enforcement response and microbial forensics in investigation of bioterrorism. *Croat Med J.* 2007; 48 (4): 437-49.
20. Martin W. Legal and public policy responses of states to bioterrorism. *Am J Public Health.* 2004; 94 (7): 1093-6.
21. McKinney WP, Wesley GC, Sprang MV, et al. Educating health professionals to respond to bioterrorism. *Public Health Rep.* 2005; 120 Suppl 1: S42-7.
22. Elderd BD, Dukic VM, Dwyer G. Uncertainty in prediction of disease spread and public health responses to bioterrorism and emerging disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103 (42): 15693-7.
23. Saito T, Takeuchi T. Research and development policy on bioterrorism medical countermeasures in the United States. *Kansenshogaku Zasshi.* 2009; 83 (1): 1-6.
24. D'Agostino M, Martin G. The bioscience revolution and the biological weapons threat: levers and interventions. *Global Health.* 2009; 5 (1): 3.
25. Brower V. Biotechnology to fight bioterrorism. While the fight against terrorism is helping to revitalize the biotech market, academic scientists are starting to worry about limitations on research. *EMBO Rep.* 2003; 4 (3): 227-9.
26. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, et al. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18 (4): 583-607.
27. Dowling KC, Lipton RL. Bioterrorism preparedness expenditures may compromised public health. *Am J Public Health.* 2005; 95 (10): 1672.
28. Shapiro DS. Surge capacity for response to bioterrorism in hospital clinical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2003; 41 (12): 5372-6.
29. Likar M. Bioterorizem - nova nevarnost [internet]. Ljubljana (SLO): Uprava RS za zaščito in reševanje; 1999 [citirano 2009 Apr 20]. Dosegljivo na: [http://www.sos112.si/slo/tdocs/ujma/2000/u\\_clanek33.pdf](http://www.sos112.si/slo/tdocs/ujma/2000/u_clanek33.pdf)
30. Hoffman RE, Norton JE. Lessons learned from a full-scale bioterrorism exercise. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6 (6): 652-3.
31. Cohen HW, Gould RM, Sidel VW. The pitfalls of bioterrorism preparedness: the anthrax and smallpox experiences. *Am J Public Health.* 2004; 94 (10): 1667-71.
32. Olson D, Leitheiser A, Atchison C, et al. Public health and terrorism preparedness: Cross-border issues. *Public Health Rep.* 2005; 120 Suppl 1: 76-83.
33. Breithaupt H. Responding to bioterrorism. *EMBO Rep.* 2001; 2 (12): 1053.

Prispelo 20. 4. 2009



Nina Hojs<sup>1</sup>, Marjan Bilban<sup>2</sup>

# Simfonija bolezni – poklicne bolezni glasbenikov

*A Symphony of Maladies – Occupational Diseases in Musicians*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** glasbeniki, poklicne bolezni, sindrom čezmerne obremenitve, žariščne distonije, akustična travma

Skoraj polovica glasbenikov se sooča z zdravstvenimi težavami, povezanimi z igranjem glasbil. Lastnosti posameznika in glasbilo, ki ga glasbenik igra, vplivajo na tip zdravstvenih težav. Najpogostejše zdravstvene težave glasbenikov so mišičnoskeletne (»sindrom čezmerne obremenitve«), nevrološke (utesnitvene nevropatije in žariščne distonije), kožne, slušne in psihične. Glasbeniki pa imajo lahko zaradi igranja glasbil tudi zobne, srčnožilne, respiratorne in očne težave. Čeprav te zdravstvene težave pogosto ne ogrožajo življenja, pa močno onemogajo in lahko pogubijo glasbenika fizično, psihično, socialno in finančno. Zato je pomembno, da se glasbeniki in zdravniki zavedajo bolezni, ki so lahko posledica glasbenikovega ustvarjanja, ter ukrepajo, še preden se težave pojavijo.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** musicians, occupational diseases, overuse syndrome, focal dystonias, acoustic trauma

Almost half of the musicians are confronted with playing-related health problems. The characteristics of an individual performer and the type of musical instrument played determine the musician's health problems. These are mainly musculoskeletal (»overuse syndrome«), neurologic (entrapment neuropathies, focal dystonias), dermatologic, otolaryngologic and psychological disorders. Other possible health problems are dental, cardiovascular, respiratory and ophthalmic. Although these health problems aren't life-threatening illnesses, they can be devastating to musicians physically, emotionally, socially, and financially. Therefore it is important to raise the awareness of musicians and doctors of playing-related health problems and to take measures before these health problems even emerge.

*There's an insect in your ear  
If you scratch it won't disappear  
It's gonna itch and burn and sting  
You want to see what the scratching brings  
Waves that leave me out of reach  
Breaking on your back like a beach  
Will we ever live in peace?*

U2, Staring at the sun

*My ears are ringin'  
Ringin' like empty shells  
Well, it can't be no guitar player  
It must be convent bells*

Bob Dylan, Call Letter Blues

---

<sup>1</sup> Nina Hojs, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; mbnina4@yahoo.com

<sup>2</sup> Prim. prof. dr. Marjan Bilban, dr. med., Zavod za varstvo pri delu, d. d., Chengdujska 25, 1000 Ljubljana

## UVOD

Že stari Grki so trdili, da je glasba poleg športa osnova za zdravje. Danes poznamo mnogo pozitivnih učinkov glasbe, med drugim zmanjša stres, izboljša športne rezultate in motorično funkcijo bolnikov s parkinsonizmom ter bolnikov po možganski kapi (1).

Kako pa ustvarjanje glasbe vpliva na glasbenike? Tako kot pri vseh poklicih poznamo tudi poklicne bolezni glasbenikov. Raziskave kažejo, da se skoraj polovica glasbenikov sooča z zdravstvenimi težavami, povezanimi z igranjem glasbil. Lastnosti posameznika in glasbilo, ki ga glasbenik igra, vplivajo na tip zdravstvenih težav (2). Glavne zdravstvene težave glasbenikov so mišičnoskeletne, nevrološke, kožne, slušne in psihične. Nekatere od teh ogrožajo ali pa so celo vzrok zaključka glasbenikove kariere.

Eden izmed prvih, ki je prepoznal poklicne bolezni glasbenikov, je bil italijanski zdravnik Bernardino Ramazzini (3). Njegove ugotovitve segajo v prvo polovico 18. stoletja. Takrat se je rodila trenutno hitro razvijajoča se »medicina umetnosti« (angl. *performing arts medicine*).

## MIŠIČNOSKELETNE BOLEZNI

Mišičnoskeletne bolezni predstavljajo najpogostejšo zdravstveno težavo glasbenikov. Večinoma so posledica preobremenitve mišic ob izvajanju ponavljajočih se gibov in dolgega držanja glasbila v nenaravnih položajih (3). Govorimo o mišičnoskeletnih boleznih, povezanih z igranjem (angl. *playing related musculoskeletal disorders*, PRMD) oziroma o t. i. sindromu čezmerne obremenitve (angl. *overuse syndrome*), ki zajema zdravstvene težave, kot so tendinitis (vnetje kit), tendosinovitis (vnetje kitnih ovojnic), distonije (bolezensko spremenjen tonus mišic) itd. Za sindrom čezmerne obremenitve sta značilni bolečina in izguba funkcije v določenih mišičnih skupinah. Kaže se kot mišična slabost, izguba kontrole, natančnosti in spretnosti izvajanja gibov. Težave so povezane s časom in intenzivnostjo vadbe, nagnjenostjo k mišičnoskeletnim težavam in tehniko igranja glasbila. Včasih se pred bolečino pojavi občutek togosti in mravljinčenja. Najpogosteje se sindrom čezmerne obremenitve pojavi pri godal-

cih, najredkeje pri tolkalcih. Pogostejši je pri ženskah kot pri moških (2). Edino zanesljivo zdravljenje je počitek. Protivnetna zdravila, mišični relaksanti, akupunktura, psihoterapija in svetovanje ne vplivajo bistveno na potek bolezni (3).

Pri godalcih so zaradi držanja glasbila večinoma prizadete mišice vratu in ramen, fleksorji in ekstenzorji desne roke, mišice, ki držijo levo roko odklonjeno v ularno smer, ter mišice, ki razprostrejo prste leve roke.

Pri pihalcih so mišičnoskeletne težave odvisne od glasbila. Pri igranju flavte je večinoma prizadeta desna rama, saj je med igranjem v abduciranem in navzven obrnjenem položaju. Medprstne mišice med palcem in kazalcem pa so obremenjene pri držanju klarineta, oboe in angleškega roga (3).

Pri igranju trobil so najpogosteje prizadete mišice ustnic (3). Za pravilen položaj ustnic med igranjem trobil sta namreč potrebna mišična moč in spretnost ustnic, še posebej pri višjih in glasnejših tonih. Primer okvare je Satchmov sindrom, ki je posledica pretrganja ustne orbikularne mišice. Kaže se kot zmanjšana moč in gibčnost ustnih mišic, šibkost med pihanjem in nezmožnost ustvarjanja visokih tonov. Najpogosteje se pojavi pri trobentačih, zdravi se lahko s počitkom ali kirurško. Zaradi omenjenih težav je za 1 leto opustil igranje trobente Louis Armstrong – Satchmo, po njem se sindrom tudi imenuje.

Glasbeniki, ki igrajo glasbila s klaviaturo, pa imajo večinoma težave z ekstenzorji zapestja in prstov, lumbrikalnimi mišicami obeh rok (še posebej prstanca in mezinca) in interesalnimi mišicami desne roke (3).

## BOLEZNI ŽIVČEVJA

Glasbeniki imajo nevrološke težave predvsem v obliki utesnitvenih nevropatij in žariščnih distonij. Pogosto prizadeta živca sta ularni in mediani. Kar 30 % glasbenikov z mišičnoskeletno boleznijo ima hkrati utesnitveno nevropatijo (4). Žariščne distonije predstavljajo neželjeno mišično krčenje, ki lahko prizadene del oz. celotno roko ali mišice ustnic. Možnosti zdravljenja so dajanje injekcij botulinosovega toksina, senzorno-motorično pretreniranje, tehnične vaje in razvijanje ergonomskih glasbil (5). Kljub vsem možno-

stim je žariščna distonija zelo odporna na zdravljenje.

Pri godalcih je najpogostejša utesnitvena nevropatija medianusa (sindrom zapestnega prehoda), možna je tudi utesnitev radialisa in prstnih živcev. Pri violinistih in violistih je zaradi drže glasbila pogosta utesnitev ulnarnega živca. Žariščne distonije se pri godalcih večinoma pojavijo na levi roki, s katero izvajajo fine motorične gibe.

Pri pihalcih se poleg perifernih mononevropatij lahko pojavijo tudi mononevropatije možganskih živcev. V literaturi obstaja primer oboista z izgubo občutka v zgornji ustnici (področje maksilarne veje trigeminusa) po intenzivnem igranju oboe ter primer klarinetista z nevralgijo trigeminusa v področju maksilarne veje med intenzivnim igranjem (3). Klarinetisti, ki igrajo lestvične prehode, pa se lahko soočijo tudi z žariščno distonijo v obliki ekstenzije sredinca in fleksije prstanca ter mezinca (večinoma na desni roki).

Tudi pri pihalcih obstaja nevarnost utesnitvenih nevropatij, še bolj pa žariščnih distonij s prizadetostjo ustnih mišic in mišic jezika (»distonija *embouchure*« – žariščna distonija mišic ust, čeljusti in jezika zaradi uporabe le-teh pri kontroli pretoka zraka skozi ustnik pihala). Žariščne distonije so najpogostejše pri glasbenikih, ki igrajo na klaviature. Pri njih se večinoma pojavi neželena fleksija prstanca in mezinca desne roke. S problemom žariščne distonije se je pri enaindvajsetih letih soočil tudi znan pianist in komponist Robert Schumann (6). Med igranjem klavirja ni mogel več kontrolirati gibanja sredinca na desni roki. Zato je v tem obdobju spisal virtuosno delo za klavir *Toccata, Op. 7.*, za izvedbo katerega ni potreben sredinec desne roke. Od takrat naprej je skoraj popolnoma opustil igranje klavirja in se predal skladanju.

Glasbeniki lahko trpijo tudi zaradi drugih nevroloških težav. V literaturi je naveden primer trobentača, ki se mu je med nastopom razvil spontani cervikotorakalni epiduralni hematoma (3). Hrup, kateremu so izpostavljeni glasbeniki, pa lahko privede tudi do motenj v delovanju možganov (raztresenost, razdražljivost, motnje koncentracije, motena koordinacija itd.) ter semicirkularnih kanalov in labirinta (vrtoglavica, motnje ravnotežja itd.) (7, 8).

## DERMATOLOŠKE BOLEZNI

Dolgotrajen stik z glasbilo lahko povzroči nastanek dermatitisa. Dražljivci so nikelj pri trobentah, krom in medenina pri kitaristih, glave piščali, medeninasti ustniki, ustniki pri saksofonistih in oboistih, poseben les, smole in laki pri godalcih (5). Preparati za nego glasbil (loščila, spreji) imajo lahko poleg lokalnega tudi sistemski vpliv. V literaturi med drugim najdemo primer godalca, ki je zaradi uporabe posebnega loščila razvil aplastično anemijo (9).

Pri godalcih se lahko razvije t. i. »godalčev vrat«, ki ga predstavlja področje hiperpigmentirane in lihenificirane kože na levi strani vratu, pod kotom spodnje čeljustnice (3). »Godalčev vrat« je posledica kožne preobčutljivosti, vlažnosti in pritiska glasbila. Pri godalcih so bili opisani tudi »čelistov prsni koš«, »čelistovo koleno« in »čelistov skrotum«. Pri godalcih se lahko razvije tudi alergija na les ali barvo podpornika za brado in smolo na loku (dermatitis prstov, roka, obraza in vratu).

Pri pihalcih poznamo »klarinetistov heilitis« (vnetje ustnice), »saksofonistov heilitis« in »flavtistovo brado«. Slednja je lahko posledica mehničnega draženja, alergije na kovine ali obojega. Tako kot pri pihalcih se lahko tudi pri trobentačih razvije preobčutljivostna reakcija pri alergiji na nikelj. Pri kitaristih se lahko razvije »kitaristova prsna bradavica« in dermatitis (zaradi strun).

Pri pianistih, kitaristih in harfistih lahko pride do pojava paronihije (vnetje obnohtja), pri kitaristih, harfistih in godalcih do nastanka prstnih kalusov, pri kitaristih in harfistih pa še do podnohtnih krvavitev in oniholize (odstop nohtne plošče od podnohtja). Posebnost pri godalcih so Garrodovi vozlički, ki predstavljajo zadebelitve tkiv na interfalangealnih sklepkih prstov rok. Podobni so Heberdenovim in Bouchardovim vozličem (5).

## OTORINOLARINGOLOŠKE TEŽAVE

Glasbeniki so občasno izpostavljeni nivoju hrupa, ki presega dovoljene meje hrupa na delovnem mestu. Zaradi nihanja nivoja hrupa in le občasno izpostavitve visokemu nivoju hrupa je težko oceniti nevarnost za izgubo



Tabela 1. Spodnje in zgornje opozorilne ter mejne vrednosti izpostavljenosti hrupu v osemurnem delavniku, kot jih določa Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti hrupu pri delu (10).

Vrednosti izpostavljenosti hrupu v osemurnem delavniku	Raven dnevne izpostavljenosti hrupu (L (EX,8h)) (dB(A))	Konična raven zvočnega tlaka (Pa)
Spodnja opozorilna vrednost	80	112
Zgornja opozorilna vrednost	85	140
Mejna vrednost	87	200

sluha. Kljub vsemu pa lahko trdimo, da obstaja pri glasbenikih grožnja izgube sluha.

V Sloveniji je od leta 2006 na novo sprejet Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti hrupu pri delu (10). Določene so spodnje in zgornje opozorilne ter mejne vrednosti izpostavljenosti hrupu v osemurnem delavniku (tabela 1).

Predpisani so tudi ukrepi za preprečevanje ali zmanjšanje izpostavljenosti ter o uporabi osebne varovalne opreme. Vendar glasbeniki skupaj z drugimi izvajalci, tehničnim osebjem ter drugimi udeleženci na glasbenem in razvedrilnem področju predstavljajo posebno skupino v zvezi z izpostavljenostjo hrupu. Pri njih obstaja resno tveganje pri delu v hrupnem okolju, po drugi strani pa je glasbeno in razvedrilno področje izredno občutljivo za slušno spremljanje okolja. Zato protihrupni ukrepi, ki so sprejemljivi za večino drugih področij, tukaj v glavnem niso zaželeni. Ministrstvo za delo, družino in socialne zadeve je zato pripravilo in objavilo v Uradnem listu RS, št. 96/2007, Praktične smernice za varovanje delavcev pred hrupom na glasbenem in razvedrilnem področju, kot to določa Pravilnik o varovanju delavcev pred izpostavljenostjo hrupu (Uradni list RS, št. 17/2006, 18/2006 – popr.) (11). Smernice določajo skupine poklicev na glasbenem in razvedrilnem področju, ki jih ogroža hrup na delovnem mestu, splošne zahteve za znižanje izpostavljenosti delavcev hrupu, vrednotenje hrupa pri glasbenikih ter ukrepe pri čezmernih obremenitvah in strategije za znižanje izpostavljenosti hrupu.

Obremenitev glasbenika znotraj orkestra je med drugim odvisna od glasbila, ki ga igra (tabela 2) (11). Izpostavljenost glasbenika hrupu pa je odvisna tudi od glasbene zvrsti in načina glasbene izvedbe (tabela 3) (11).

Posebej so ogroženi izvajalci rock in pop glasbe, medtem ko pri izvajalcih klasične glasbe opažajo predvsem izgubo sluha za visoke frekvence (12, 13). V eni izmed raziskav so tudi ugotovili, da imajo violinisti in violisti slabši sluh na levem ušesu (13).

Za zmanjšanje tveganja akustične travme glasbenikom predlagajo uporabo dušilnikov za trobila, slušalk in ušesnih čepov, kontrolo krvnega tlaka, sladkorne bolezni itd. K zmanjšanju tveganja lahko pripomore tudi zamenjava pozicij glasbenikov znotraj orkestra, razporeditev glasbenikov, da sosednja glasbila usmerjajo zvok čim bolj proti občinstvu in čim manj proti glasbenikom ter drugim zaposlenim (npr. z večanjem višine podestov glasbenikov v zadnjih vrstah, primernih odda-

Tabela 2. Izpostavljenost glasbenikov hrupu posameznega glasbila v orkestru (11).

Glasbilo	Izpostavljenost (dB(A))
Viola	86
Čelo	86
Kontrabas	83
Mala flavta (piccolo)	95
Druga pihala	89
Trobenta	92–94
Harfa	87
Talkala	95

Tabela 3. Izpostavljenost glasbenikov hrupu glede na vrsto glasbe (11).

Vrsta glasbe	Raven hrupa (dB(A))
Orkestralna glasba	80–95
Rock in pop glasba	95–110
Jazz in narodna glasba	90–98

ljenosti drug od drugega ipd.), primerno grajena in opremljena dvorana oz. avditorij ter dirigent z izbiro glasbe in rednimi pavzami med vajami (11, 13, 14).

Pri velikem številu glasbenikov sta prisotni tudi hiperakuzija (prevelika občutljivost na neznatno glasbo) in algiakuzija (bolečina ob intenzivnem hrupu). Znani pevci, kot so Eric Clapton, Neil Young, Sting, Bono in Phil Collins naj bi trpeli zaradi zvonjenja v ušesih (tinitus), ki naj bi bil posledica njihovega glasbenega ustvarjanja (15).

Oboisti, trobentači in igralci roga morajo za ustvarjanje glasnih ali visokih tonov uporabljati visokotlačne, Valsalvi podobne manevre, ki lahko povzročijo insuficienco grla (5). Slednja se kaže z nosljajočim govorom, regurgitacijo tekočin in sikanjem med igranjem glasbila. To lahko zdravimo z mirovanjem, govorno terapijo ali kirurško.

Pri pihalcih in trobilcih se lahko zaradi visokih pritiskov znotraj ustne votline razvije tudi laringokela, ki predstavlja izbočenje stene grla v laringealnem ventriklu (3). Večina je laringokela zapolnjena z zrakom.

## MAKSILOFACIALNE TEŽAVE IN ZOBNE BOLEZNI

Violinisti in violisti imajo lahko zaradi drže glasbila pod levo stranjo spodnje čeljustnice težave s čeljustjo (3). Te se kažejo kot bolečina in krepitacije v področju temporomandibularnega sklepa, zmanjšana gibljivost spodnje čeljustnice, povečan odklon spodnje čeljustnice v desno ob odprtju ust in nagnjenost k nehotnemu škripanju z zobmi med spanjem (bruksizem). Simptomatični violinisti in violisti morajo spremeniti tehniko igranja, tako da zmanjšajo pritisk glasbila ob spodnjo čeljustnico in s tem bolečino in disfunkcijo.

Pri trobentačih lahko prevelik pritisk na ustnik vodi do bolečin v temporomandibularnem sklepu in postopne premestitve sprednjih zob (5). Pri njih obstaja tudi nevarnost Satchmovega sindroma, ki je opisan pri mišičnoskeletnih boleznih.

## SRČNOŽILNE BOLEZNI

Pri glasbenikih lahko opazamo sinusno tahikardijo zaradi strahu pred nastopom (16, 17).

Izvajanje Valsalvinega manevra pri pihalcih in trobilcih je povezano s spremembami v krvnem tlaku in srčnem ritmu. Za pihalce obstajajo v literaturi primeri disekcije karotidne arterije med igranjem glasbila, kar je verjetno posledica zvišanega tlaka znotraj prsnega koša med igranjem (18). Večjo smrtnost pri pihalcih, še posebej saksofonistih, v primerjavi z ostalimi glasbeniki, razlagajo tudi z zvišanim tlakom v vratu med igranjem in posledično zmanjšano prekrvavitvijo možganov (19). Pri pregledu literature najdemo tudi podatke o trobentaču, ki je doživljal prehodne motnje prekrvavitve možganov med intenzivnim igranjem. Te so bile posledica odprtega ovalnega foramina, ki je omogočal prehod mikroembolov v srednjo možgansko arterijo (3). V neki raziskavi so opazili, da se pri igralcih francoskega roga med igranjem pojavi potujoča spodbujevalna aktivnost srca (3).

Na srčnožilni sistem pa vpliva tudi hrup, kateremu so izpostavljeni glasbeniki. Hrup povzroča tahikardijo, povečuje tveganje za koronarno bolezen (povečuje vrednost holesterola, trigliceridov in LDL holesterola), povezan je z arterijsko hipertenzijo itd. (7, 8).

## BOLEZNI DIHAL

Mnogi glasbeniki so med ustvarjanjem v barjih in klubih izpostavljeni tobačnemu dimu, s tem pa pasivnemu kajenju. Stopnja nevarnosti je odvisna od načina prezračevanja prostora ter od prisotne vrste onesaženja. Sestava dima, ki ga pasivno vdihne nekadilec, je podobna sestavi dima, ki ga vdihne kadilec. Tveganje za boleznijo je pri pasivnem kajenju sicer manjše, je pa vzročno povezano s pljučnim rakom in nakazano povezano z nekaterimi drugimi raki (rak dojke, obnosnih votlin, materničnega vratu) (20). Večja je nevarnost za nastanek okužb, daljša izpostavljenost pa poveča nevarnost za nastanek bolezni srca in ožilja (21). Tobačni dim lahko povzroči tudi draženje oči, glavobol, kašelj, bolečine v žrelu, vrtoglavico in slabost.

Dve raziskavi sta pokazali, da imajo pihalci zmanjšano funkcijo dihal v primerjavi s kontrolno skupino, kar je lahko posledica pojava astme ali barotravme med igranjem (22, 23). V drugi raziskavi pa so ugotovili, da igranje pihal zmanjša simptome astme pri mladostnikih (24).

## OČESNE BOLEZNI

Obstaja povezava med igranjem pihal in trobil (glasbil z velikim uporom) ter pojavom zvišanega očesnega tlaka in posledično večjo pojavnostjo izgube vidnega polja (25). To naj bi bilo posledica zvišanega tlaka v prsnem košu med igranjem, ki povzroči stisnjenje znotrajtorakalnega venskega sistema, s tem pa zastajanje krvi v žilnici in zvišan očesni tlak.

## PSIHOLOŠKE TEŽAVE

Vsi glasbeniki so izpostavljeni stresu, še posebej strahu pred nastopi. Psihološka napetost pogosto pripomore k pojavu somatiformnih motenj, lahko pa prispeva tudi h kronifikaciji drugih zdravstvenih težav (26). Za zmanjšanje simptomov straha pred nastopi mnogi glasbeniki nekontrolirano jemljejo beta-adrenergične antagoniste (2). Znan čelist Pablo Casals je celo življenje trpel zaradi strahu pred nastopi, svetovno znani pianist Vladimir Horowitz pa zaradi enake težave ni javno nastopil celo desetletje (27). Glasbeniki na turnejah so izpostavljeni še mnogim drugim stresnim dejavnikom, kot so večurna potovanja, pomanjkanje zdrave hrane in telovadbe, odsotnost od doma itd. (5). Mnogi uspešni glasbeniki se zaradi tega zatečejo k zlorabi drog in alkohola, s tem pa do življenje ogrožajočega obnašanja (28). Znani glasbeniki, ki so zlorabljali alkohol in droge, so bili Kurt Cobain, Jimi Hendrix, Janis Joplin, Elvis Presley, Charlie »Yardbird« Parker, Cole Porter itd. (29).

Dolgotrajna izpostavljenost hrupu pa privede do povečane razdražljivosti, nejevoljnosti, anksioznosti, občutka ogroženosti in neprenašanja okolice. Vse to lahko vodi do osebnostnih in duševnih sprememb (7, 8). Hrup tudi pospešuje razvoj latentne nevroze.

## PRIMER ZDRAVSTVENIH TEŽAV PRI GLASBENIKIH SLOVENSKEGA FILHARMONIČNEGA ORKESTRA

Leta 1994 je bila prvič izvedena ocena tveganja za zdravje slovenskih glasbenikov, v raziskavi je sodelovalo 70 glasbenikov Slovenskega filharmoničnega orkestra (30). Njihove najpogostejše zdravstvene težave so bile mišič-

noskeletne, ki so se kazale kot bolečina in težave s prizadetim delom telesa. Najpogosteje so imeli te težave čelisti, kontrabasisti in harfisti, in sicer v področju ramen, rok in lumbosakralne hrbtenice. Najpogosteje je bilo pri violinistih in violistih prizadeto področje vratne in prsne hrbtenice; pri bobnarjih komolec (večinoma desni) in prsti; pri pianistih pa večinoma desni komolec. Statistične razlike v pojavnosti mišičnoskeletnih boleznih med skupinami glasbenikov glede na starost, čas igranja glasbila in čas nastopa niso ugotovili. Zanimivo je, da so v primerjavi s slovenskimi glasbeniki imeli glasbeniki Berlinskega opernega orkestra mišičnoskeletne težave najpogosteje v področju vratne hrbtenice, sledila je ledvena hrbtenica, rami in roki ter prsna hrbtenica.

Druga najpogostejša zdravstvena težava slovenskih glasbenikov je bila poslabšanje sluha (22,8%; predvsem v povezavi z nastopom). Druge zdravstvene težave, s katerimi so se soočali glasbeniki, so bile endokrine (debelost, motnje v metabolizmu lipidov), srčnožilne (hipertenzija, varikozne vene na spodnjih udih) in psihološke težave (predvsem nevroze). Zanimivo je, da noben glasbenik Slovenskega filharmoničnega orkestra ni imel žariščnih distonij.

## ZAKLJUČEK

Glasbenikovo zdravje je marsikdaj ogroženo zaradi njegovega poklica. Čeprav te zdravstvene težave pogosto ne ogrožajo življenja, pa močno onespособijo in lahko pogubijo glasbenika fizično, psihično, socialno in finančno (31). Zato je pomembno, da se glasbeniki zavedajo boleznih, ki so lahko posledica njihovega ustvarjanja. Nujno pa je, da se tudi zdravniki zavedajo poklicnih boleznih glasbenikov in posebnosti, ki jih bolezni predstavljajo za glasbenikovo ustvarjanje in življenje. V sklopu preprečevanja poklicnih boleznih glasbenikov je potrebno prepoznati notranje in zunanje dejavnike, ki vplivajo na glasbenikovo delovanje. Potrebno je osveščanje študentov glasbe o možnih zdravstvenih težavah, povezanih z igranjem glasbila, skrb za dobro fizično kondicijo, uporaba pravilnih tehnik igranja in zgodnja obravnava zdravstvenih težav (32). Mnogi glasbeniki pridejo do zdravnikov šele v napredovali fazi bolezni, ko je mirovanje

nujen, toda slabo sprejet način zdravljenja. Vsekakor pa so potrebne še dodatne raziskave o poklicnih boleznih glasbenikov in razi-

skave v zvezi z zgradbo glasbil, da bi zmanjšali pojavnost boleznih, povezanih z uporabo določenega glasbila (3).

## LITERATURA

- Bernardi L, Porta C, Sleight P. Cardiovascular, cerebrovascular, and respiratory changes induced by different types of music in musicians and non-musicians: the importance of silence. *Heart*. 2006; 92: 445-52.
- Lockwood AH. Medical problems of musicians. *N Engl J Med*. 1989; 320: 221-7.
- Liu S, Hayden GF. Maladies in musicians. *South Med J*. 2002; 95: 727-34.
- Amadio PC. Management of nerve compression syndrome in musicians. *Hand Clin*. 2003; 19: 279-86.
- Altenmüller E. Robert Schumann's Focal Dystonia. In: Bogousslavsky J, Boller F, eds. *Neurological Disorders in Famous Artists*. Front Neurol Neurosci. Basel: Karger; 2005. Vol 19. p. 179-88.
- Bache S, Edenborough F. A symphony of maladies. *BMJ*. 2008; 337: 1458-60.
- Bilban M. Hrup kot spremljevalec sodobnega življenja. *Delo in varnost*. 2005; 50: 8-12.
- Bilban M. Vpliv hrupa na človeka. *Delo in varnost*. 2005; 50: 13-22.
- Boga C, Ozdogu H, Tamer L, et al. Aplastic anemia in a professional musician exposed to instrument polish. *Int J Hematol*. 2005; 81 (4): 304-6.
- Pravilnik o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti hrupu pri delu. Uradni list RS, št. 17/2006.
- Praktične smernice za varovanje delavcev pred hrupom na glasbenem in razvedrilnem področju. Uradni list RS, št. 96/2007.
- Stormer CC, Stenklev NC. Rock music and hearing disorders. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2007; 127: 874-7.
- Morais D, Benito JI, Almaraz A. Acoustic Trauma in Classical Music Players. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58: 401-7.
- McBride D, Gill F, Proops D, et al. Noise and the classical musician. *BMJ*. 1992; 305: 1561-3.
- Famous people and musicians with tinnitus [internet]. [citirano 2009 Jan 14]. Dosegljivo na: <http://tinpan.fortunecity.com/melody/73/tinnitus.html>
- Mulcahy D, Keegan J, Fingret A, et al. Circadian variation of heart rate is affected by environment: a study of continuous electrocardiographic monitoring in members of a symphony orchestra. *Br Heart J*. 1990; 64: 388-92.
- Iñesta C, Terrados N, García D, et al. Heart rate in professional musicians. *J Occup Med Toxicol*. 2008; 3: 16.
- Evers S, Altenmüller E, Ringelstein EB. Cerebrovascular ischemic events in wind instrument players. *Neurology*. 2000; 55: 865-7.
- Kinra S, Okasha M. Unsafe sax: cohort study of the impact of too much sax on the mortality of famous jazz musicians. *BMJ*. 1999; 319: 1612-3.
- U. S. Department of Health and Human services. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A report of the Surgeon General-Executive Summary [internet]. U. S. Department of Health and Human services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Centre for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2006 [citirano 2009 Aug 27]. Dosegljivo na: [http://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/sgr/2006/index.htm](http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/2006/index.htm)
- Bilban M. Aktivno in pasivno kajenje v delovnem okolju. *Delo in varnost*. 2006; 51: 27-40.
- Deniz O, Savci S, Tozkoparan E, et al. Reduced pulmonary function in wind instrument players. *Arch Med Res*. 2006; 37: 506-10.
- Gilbert T. Breathing difficulties in wind instrument players. *Md Med J*. 1998; 47: 23-7.
- Lucia R. Effects of playing a musical wind instrument in asthmatic teenagers. *J Asthma*. 1994; 31: 375-85.
- Schumann JS, Massicotte EC, Connolly S, et al. Increased intraocular pressure and visual field defects in high resistance wind instrument players. *Ophthalmology*. 2000; 107: 127-33.
- Schuppert M, Altenmüller E. Occupation-specific illnesses in musicians. *Versicherungsmedizin*. 1999; 51: 173-9.
- Reynolds R. Performance anxiety. *The Double Reed*, Vol. 16, No. 1 [internet]. 1993 [citirano 2009 Jan 12]. Dosegljivo na: <http://www.idrs.org/publications/DR/DR16.1/DR16.1.Reynolds.html>
- Bellis MA, Hennell T, Lushey C, et al. Elvis to Eminem: quantifying the price of fame through early mortality of European and North American rock and pop stars. *J Epidemiol Community Health*. 2007; 61: 896-901.
- Fleming N. Rock and pop stars do 'live fast, die young'. *Telegraph Media Group* [internet]. [objavljeno 2007 Sep 3, citirano 2009 Jan 20]. Dosegljivo na: <http://www.telegraph.co.uk/news/uknews/1562036/Rock-and-pop-stars-do-live-fast-die-young.html>
- Črničev R. Assessment of Health Risks in Musicians of the Slovene Philharmonic Orchestra Ljubljana, Slovenia. *Med Probl Perform Art*. 2004; 19: 140-5.
- Zaza C, Charles C, Muszynski A. The meaning of playing-related musculoskeletal disorders to classical musicians. *Soc Sci Med*. 1998; 47: 2013-23.
- Dupuis M. Pathologies of the musculo-skeletal system in musicians. *Union Med Can*. 1993; 122: 432-6.

# doreta<sup>®</sup>

tramadol in paracetamol 37,5 mg in 325 mg  
filmsko obložene tablete



## Usklajeno nad bolečino

**Novo iz Krke**

## Doreta (tramadol paracetamol)

**Sestava** Ena filmsko obložena tableta vsebuje 37,5 mg tramadolijevga klorida, kar ustreza 32,94 mg tramadola, in 325 mg paracetamola. **Indikacija** Simptomatsko zdravljenje srednje močnih do močnih bolečin. **Odmerjanje in način uporabe** Odrasli in mladostniki (12 let in starejši) Odmerjek je treba individualno prilagoditi glede na jakost bolečine in bolnikov odziv. Kot začetni odmerek se priporočata 2 tableti Dorete. Po potrebi bolnik lahko vzame dodatni odmerek, vendar ne več kot 8 tablet na dan. Med posameznimi odmerki naj ne mine manj kot šest ur. **Otroci** Pri otrocih, mlajših od 12 let, učinkovita in varna uporaba Dorete ni bila dokazana, zato zdravljenja z njo ne priporočamo. **Kontraindikacije** Preobčutljivost za zdravilni učinkovini ali katerikoli pomožni snov. Akutna zastrupitev z alkoholom, uspalavi, centralno delujočimi analgetiki, opioidi ali psihotropnimi zdravili. Dorete ne smejo jemati bolniki, ki jemljejo zaviralce monoaminooksidaze (MAO) ali pa so jih prenehali jemati pred manj kot dvema tednoma. Huda jetrna okvara. Nezadostno zdravljena epilepsija. **Previdnostni ukrepi** Doreto moramo uporabljati previdno pri bolnikih, odvisnih od opioidov, bolnikih s poškodbami glave, bolnikih, ki so nagnjeni h konvulzivnim motnjam, bolnikih z motnjami delovanja žolčnega trakta, bolnikih v šoku, bolnikih z motnjami zavesti neznanega vzroka, z okvarami dihalnega centra ali dihalne funkcije ter pri bolnikih z zvišanimi intrakranialnim tlakom. **Medsebojno delovanje z drugimi zdravili in druge oblike interakcij** Odsvetujemo pitje alkohola, sočasno jemanje s karbamazepinom in drugimi encimskimi induktori, z opioidnimi agonisti in antagonistami (buprenorfinom, nalbupinom, pentazocinom). Interakcije lahko

nastopijo pri sočasnem jemanju Dorete s serotonergičnimi zdravili, z drugimi zaviralci osrednjega živčevja, z varfarinom podobnimi snovmi, z drugimi zdravili, ki zavirajo CYP3A4, in z zdravili, ki znižujejo prag za nastanek krčev. **Nosečnost in dojenje** Doreta vsebuje fiksno kombinacijo zdravilnih učinkovin, tudi tramadola, zato naj je ne bi jemale nosečnice in matere, ki dojijo. **Preveliko odmerjanje** Pri prevelikem odmerjanju se lahko pojavijo znaki in simptomi zastrupitve s tramadolom ali paracetamolom oziroma z obema zdravilnima učinkovinama. **Posebno opozorilo** Največji odmerek pri odraslih in mladostnikih, starejših od 12 let, naj ne preseže 8 tablet zdravila Doreta na dan. Da ne bi prišlo do nenamernega prevelikega odmerjanja, je treba bolnike opozoriti, naj ne presežejo priporočenega odmerka in naj brez posvetovanja z zdravnikom sočasno ne jemljejo nobenega drugega zdravila, ki vsebuje paracetamol (vključno z zdravili, ki se dobijo brez recepta) ali tramadolijev klorid. **Neželeni učinki** Najpogostejši neželeni učinki, ki so se pojavili pri kliničnih preskušanjih, opravljenih s kombinacijo paracetamola in tramadola, so bili navzea, omotica in zaspanost. Pogosto se lahko pojavijo glavobol, tresenje, zmedenost, sprememba razpoloženja (anksioznost, nervoznost, evforija), motnje spanja, prebavne motnje (bruhanje, zaprtje, suha usta, driska, bolečine v trebuhu, dispepsija, flatulenca), potenje in srbečica. **Način izdajanja** Zdravilo se izdaja samo na recept. **Oprema** 2 filmsko obloženi tableti (pretni omoti z 2 tabletama) ali 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 in 100 filmsko obloženih tablet (pretni omoti po 10 tablet), v škatli. Na trgu ni vseh navedenih pakiranj. **Datum priprave besedila** September 2009.

Samo za strokovno javnost. Pred uporabo preberite celoten povzetek glavnih značilnosti zdravila.  
Krka, d. d., Novo mesto, Šmarješka cesta 6, 8501 Novo mesto, www.krka.si

 KRKA

*Naša inovativnost in znanje  
za učinkovite in varne  
izdelke vrhunske kakovosti.*

Kristijan Jezernik<sup>1</sup>, Mateja Erdani Kreft<sup>2</sup>

# Tesnostične pregrade v našem telesu

## *Tight Junction Barriers in Our Body*

---

### IZVLEČEK

---

**KLJUČNE BESEDE:** tesni stik, pregrada – bariera, bolezni

Tesni stiki so odločilni medcelični stiki, ki gradijo epitelijske pregrade. Oblikujejo molekularnim poram podobne strukture, ki obkrožajo vrhove posameznih celic. Nadzirajo prehajanje malih molekul med apikalnimi in bazolateralnimi kompartmenti. Oblikujejo razvejane mreže pečatnih povezav iz transmembranskih proteinov, kot so okcludin in klavdini, katerih zunajcelične domene se med seboj neposredno povezujejo. Na citosolni strani plazmaleme pa so v povezavi z različnimi submembranskimi proteini, ki posredujejo povezavo z aktinskim citoskeletom. To delo podaja pregled spoznanj o zgradbi in funkciji proteinov, ki gradijo tesne stike ali so z njimi povezani. Zbrani so podatki o tesnostičnih proteinih v epitelijih sesalcev ter o njihovih vlogah pri nekaterih boleznih. Razpravljamo tudi o možnostih koriščenja spoznanj o tesnih stikih za namene izboljšane tarčnega vnosa učinkovin v telo.

---

### ABSTRACT

---

**KEY WORDS:** tight junction, barrier, diseases

Tight junctions comprise a crucial part of epithelial barriers by forming a molecular pore like structure that encircles the apex of individual cells. They control the passage of small molecules between apical and basolateral compartments. Junctions are composed of a branching network of sealing strands. Each strand is formed from a row of transmembrane proteins namely occludin and claudins, embedded in both plasma membranes, with extracellular domains joining one another directly. These associate with different peripheral membrane proteins located on the intracellular side of plasma membrane, which anchor the strands to the actin cytoskeleton. This overview gives a detailed survey about the proteins associated with tight junctions, their structure and functions including a wealth of the relevant literature. We summarize our knowledge about tight junction proteins in mammalian epithelial tissue and their involvement in some diseases. Their putative suitability as new targets for improving drug delivery is discussed.

---

<sup>1</sup> Prof. dr. Kristijan Jezernik, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana; kristijan.jezernik@mf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Doc. dr. Mateja Erdani Kreft, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

## ZGRADBA TESNIH STIKOV

Epitelijska tkiva imajo vlogo pregrad ali barier, ki ločujejo različne predelke ali kompartmente (telo od zunanosti in od notranjih telesnih votlin). Tesni stiki pa so glavne sestavine epitelijskih celic, ki v veliki meri prispevajo k pregradni vlogi epitelijev. Nameščeni so tako, da obkrožajo vrhove posameznih celic kot neke vrste poram podobne strukture in tako nadzirajo potovanje majhnih molekul in ionov med luminalnim (apikalnim) in seroznim (bazolateralnim) kompartmentom. Prepustnost za ione je različna za različne vrste epitelijev in je v osnovi določena z molekularno sestavo tesnega stika (1).

Tesni stiki spenjajo lateralne plazmaleme sosednjih celic, od tod tudi prvotno ime v latinskem jeziku *zonulae occludentes*. Na površini plazmaleme so vidni kot preplet – mreža anastomoznih, verigi podobnih povezav (slika 1). Število, dolžina in medsebojna prepletenost teh povezav se med različnimi epiteliiji močno razlikuje. Pod plazmalemo pa je opazen plak, ki ga označuje krožno potekajoč pas aktinskih filamentov (2). Tesni stik v osnovi gradijo transmembranski in submembranski proteini. Submembranski proteini se vežejo

na aktinske filamente in vključujejo tudi določene regulatorne proteine (slika 2).

## Transmembranski proteini

Okludin je bil prvi znani stični membranski protein, ki je specifično lokaliziran v področju tesnega stika (3). Njegovo izražanje pa ni nujno potrebno za oblikovanje stičnega prepleta pa tudi njegova pregradna vloga v tem smislu ni popolnoma pojasnjena (4). Drugi pomemben protein je tricelulin. Ta bi lahko prevzemal pregradno funkcijo. Po zgradbi je zelo podoben okludinu (5). Posebno veliko ga je v področjih tromej med celicami (v t. i. tromejnih povezavah). Poleg dveh naštetih skupin proteinov so v stiku gotovo najpomembnejši od  $Ca^{2+}$  neodvisni proteini klavdini, ki so nujno potrebni za oblikovanje stičnih vezi (1, 6). Do danes je poznanih vsaj 24 različnih klavdinov v klavdinski družini, vsak z značilno razporeditvijo v organih in tkivih. Ionsko selektivnost določajo regije v zanki klavdina zunaj celice, ki imajo naboj in izražajo različne izoelektrične točke. Tako je ionska selektivnost različnih epitelijev v veliki meri odvisna od vrste klavdinskih molekul, ki se izražajo v določenem epiteliiju (6). IgG-so-

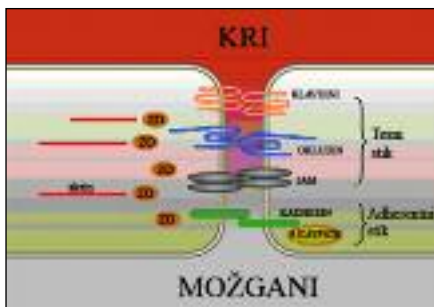


Slika 1. Tesnostične povezave v celici obušesne slinavke so vidne kot mrežast preplet na površini plazmaleme.

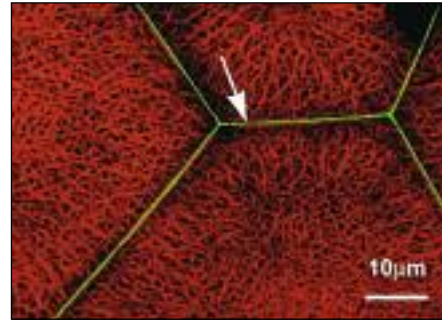
rodna družina celičnih adhezivnih molekul (JAM) so četrta skupina transmembranskih molekul tesnega stika, ki jo predstavljajo molekule JAM-A, B in C. To so homofilne in heterofilne adhezijske molekule (7). Sodelujejo pri funkciji pregrade, so pa lahko izražene tudi tam, kjer se tesni stiki ne vzpostavljajo, na primer pri transepitelijski migraciji levkocitov. Za JAM-C je znano, da regulira polarizacijo in diferenciacijo spermatidov z vključevanjem polarnega proteinskega kompleksa (razlaga v nadaljevanju). Torej ima JAM predvsem vlogo v določanju polarizacije celic in manj vlogo pregrade (8).

### Submembranski proteini

Za povezovanje okludina, klavdina in JAM-proteinov v področju tesnega stika so odločilni citoplazemsko-submembransko nameščeni povezovalni proteini, tudi t. i. ogrodni proteini. Med temi so pomembni proteini *zonula occludens*, kot so ZO-1, ZO-2 in ZO-3 (slika 2, slika 3). To so proteini iz družine membransko vezanih gvanilatno kinaznih homologov (MAGUK). Ti se lahko direktno vežejo s klavdini in preko posebne domene (PDZ1-domene) z okludinom in aktinom (9, 10). ZO-1 lahko interagira z JAM ter oblikuje homodimere ali heterodimere z ZO-2 ali ZO-3. ZO-proteini so torej najprimernejši ogrodni proteini, ki povezujejo različne transmembranske molekule s citoskeletom. Zaradi povezav med ZO-1 in ZO-2 ter klavdini je ta vrsta povezav ključna za oblikovanje tesnostičnega prepleta in njegove pregradne vloge.



Slika 2. Shematski prikaz molekularne zgradbe tesnega stika na nivoju krvno-možganske pregrade. Pod tesnostičnim kompleksom se nahaja adherentni stik. ZO – proteini *zonula occludens*.



Slika 3. Imunofluorescenčna označitev proteina ZO-1 (zeleno, puščica) kaže potek tesnega stika v površinskih urotelijskih celicah. V celici so označeni tudi citokeratini (CK 20, rdeče), ki sicer niso značilna citoskeletna sestavina tesnega stika.

Pod prepletom tesnostičnih proteinov v bazolateralni smeri celice se nahaja adherentni stik, ki lahko v določeni meri vključuje tudi posamezno molekularno komponento tesnega stika, vendar zgradba in vloga adherentnega stika presega predmet tega sestavka.

### Aktin in regulatorni proteini

Aktin je na citoplazemski strani povezan s transmembranskimi tesnostičnimi proteini. Njegova porušitev, na primer s citohalazinom, poveča medcelično ali paracelično prepustnost (permeabilnost) in zniža čezcelično ali transepitelijsko upornost. Vse to dokazuje pomembno vlogo aktina pri zagotavljanju pregradne vloge tesnega stika (11). V področju tesnega stika se nahajajo tudi proteini Rho, gvanidinski izmenjevalni faktor (GEF) in GTP-azni aktivirajoči proteini (GAP). Te regulatorne molekule lahko spreminjajo dinamiko aktina v področju tesnega stika, s čimer vplivajo tudi na stabilnost in funkcijo tesnostičnega kompleksa (12).

Prehod levkocitov skozi nepoškodovano steno krvnih žilic (med diapedezo) dokazuje, da je tesni stik strukturno in funkcijsko natančno reguliran in v določenih primerih tudi spremenljiv (13). Prehajanje skozi endotelij zahteva precejšnjo dinamiko v zgradbi in delovanju tesnega stika. V to dinamiko pa je vključeno signaliziranje, ki poteka preko klavdina, vključuje tudi endocitotske procese in preoblikovanje ključnih tesnostičnih komponent ter predvsem spreminjanje kontraktibilnosti aktina ob soudeležbi miozina.



## TESNI STIKI V VLOGI PREGRADE IN EPITELIJSKA POLARNOST

Med oblikovanjem medceličnih stikov in vzpostavitev apikalno-bazolateralne polarnosti obstaja neodvisna povezanost (14). V oblikovanju polarnosti sodelujejo v področju tesnega stika nedavno odkriti multi-proteinski t. i. polarni kompleksi, kot sta Par in CRB (Crumbs), atipična proteinska kinaza (aPCK) ter kompleks Scribble. Kompleksi imajo antagonistične učinke in se nameščajo v ločena področja membranskih domen, torej apikalno ali bazolateralno. Kompleks CRB se namešča apikalno in delno v področju tesnega stika, kompleks Scribble pa lateralno. Apikalno nameščeni kompleksi izrivajo nameščanje lateralnih in obratno. Ta prehodna medsebojna izključitev v lokaciji nameščanja polarnih kompleksov vodi do vzpostavitve in vzdrževanja apikalno-bazolateralne polarnosti epitelija (15).

Tesni stiki predstavljajo zelo učinkovito pregrado za pasivni prehod tekočin, elektrolitov, makromolekul in tudi prehod celic po medcelični (paracelični) poti. Posledično nastane zaradi različne ionske sestave snovi v zunajceličnem prostoru in medceličnem prostoru določena upornost – paracelična upornost. Tesni stiki torej vzpostavljajo določeno upornost med svetlino (lumnom) in medceličnim prostorom. Ker pa večinoma snovi potujejo skozi apikalne površine v citoplazmo in po citoplazmi na bazo celic ter nato ven iz celic, torej čez celico (transcelična pot) in le delno po medcelični poti, je celokupna in seveda specifična čezepitelijska (transepitelijska) upornost določenega tkiva oziroma upornost skozi tkivo določena kot seštevek čezcelične (transcelične) in medcelične (paracelične) upornosti. Transcelično in tudi transepitelijsko upornost izražamo v ohmih  $\text{cm}^2$  ( $\Omega\text{cm}^2$ ).

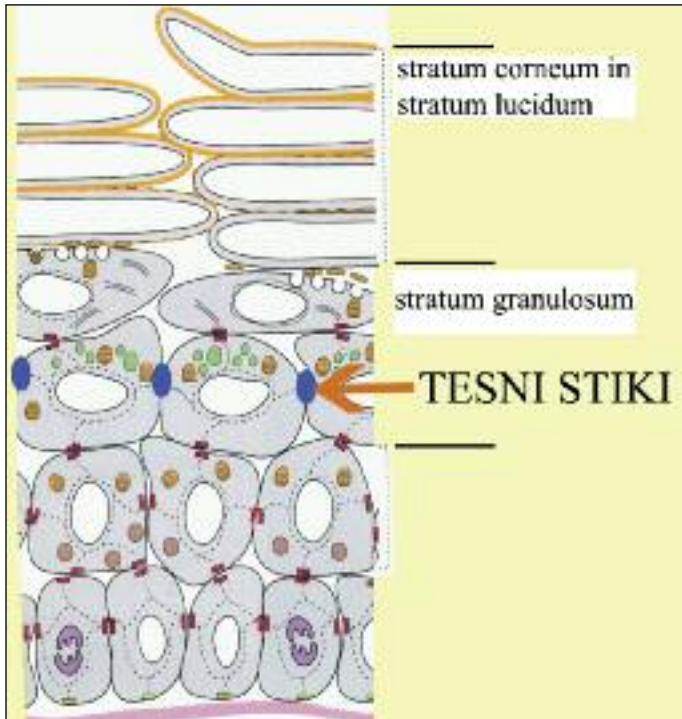
Glavnino transepitelijske upornosti v največji meri določajo tesni stiki v površinskih epitelijških celicah. Med tkiva z največjo vlogo pregrade gotovo spadata epitelij žolčnika in epitelij sečnega mehurja (urotelij). Zlasti slednji ima najmočnejši preplet tesnostičnih povezav, ki dejansko niso prehodne za vsebine v svetlini sečnega mehurja. Pregrada, ki je vzpostavljena v uroteliju, zagotavlja upornost med 10.000 in 100.000  $\Omega\text{cm}^2$ .

## Namestitev tesnostične pregrade v epitelijih

V osnovi velja, da so tesni stiki nameščeni vedno na meji apikalne in bazolateralne membranske površine enoskladnih, prehodnih in večskladnih epitelijev. Pri tem je zanimivo, da je bila v koži določena lokacija tesnih stikov in s tem pregrade šele nedavno. Dolgo časa sicer ni bilo znano, ali v večskladnih epitelijih tesni stiki sploh obstajajo. Tako so domnevali, da zlasti keratinizirani epiteliji vzdržujejo pregrado zaradi izločanja in nalaganja med seboj navzkrižno povezanih proteinov t. i. lamelarnih telesc v celicah (16). Vendar se je relativno pozno izkazalo, da so za nemoteno pregradno vlogo tudi v epidermisu (pokožnici) potrebni tesni stiki. Tesni stiki se v človeškem epidermisu nahajajo v zrnatih plasti (lat. *stratum granulosum*) (slika 4) (17, 18). Tesni stiki in *stratum corneum* ter *stratum lucidum* tako skupaj ustvarjajo funkcionalno pregrado v večskladnem epiteliju. Pri tem imajo odločilno vlogo kinaze IKK1 ter signaliziranje prek NF $\kappa$ B. Prek teh poti namreč potekajo vplivi na izražanje retinoično kislinskih tarčnih genov, ki so vključeni v zagotavljanje pregradne vloge epitelijev. Vloga tega je pomembna, da specifična lega tesnega stika v *stratum granulosum* zagotavlja tarčenje »apikalnih« proteinov in lipidnih mešičkov naravnost proti *stratum corneum*. Epidermis ni klasično apikalno-bazolateralno polarizirano tkivo, pač pa je polarizacija na apikalno in bazolateralno os epitelija dosežena s *stratum granulosum*, ki tako oblikuje vitalno apikalno mejo. Verjetno je oblikovanje tesnih stikov v nižjih plasteh epitelija zavrtlo zaradi zaviralnih signalov za oblikovanje stikov, ki prihajajo iz celic, ki nosijo tesne stike.

## TESNI STIKI V VLOGI ZAVESE

Tesni stiki preprečujejo lateralno gibljivost membranskih molekul, zaradi česar te ne morejo prehajati iz apikalnih v bazolateralne površine ali obratno. V tem smislu so tesni stiki v vlogi zaves. To nazorno dokazujejo študije o vlogi teh stikov v regulaciji rasti celic. Zaradi namestitve tesnih stikov so namreč rastni dejavniki kot ligandi in njihovi receptorji med seboj fizično ločeni v različnih membranskih domenah, eni apikalno, drugi



Slika 4. Tesni stiki (modro) so v epidermisu nameščeni v zrnati plasti (lat. stratum granulosum).

bazolateralno. Tako je na primer v dihalnem epiteliju receptor Erb3/4 lokaliziran v bazolateralni membranski domeni, njegov ligand pa se nahaja v apikalni membranski domeni (19). V primeru motnje delovanja stika in njegove vloge v smislu zavese in pregrade ter s tem tudi celične polarnosti (na primer ob poškodbi – rani ali zaradi različnih vnetnih dejavnikov) je omogočena vezava liganda in receptorja. Premiku receptorja v apikalno domeno sledi njegova aktivacija, ki lahko pripelje do intenzivne proliferacije celic.

V vzdrževanju polarnosti ima odločilno vlogo okcludin. Znano je, da je izguba polarnosti zaradi epiteljsko-mezenhimskega prehoda, ki jo povzročata transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- $\beta$ ), posledica interakcij TGF- $\beta$ , okcludina, polarnih proteinov Par6 in različnih regulatornih molekul. Prav interakcije med transmembranskimi in citoplazemskimi molekulami, skupaj s citoskeletom, pa modulirajo obe temeljni vlogi tesnega stika – vlogo pregrade in zavese.

## SIGNALIZIRANJE, KI POTEKA IZ TESNEGA STIKA

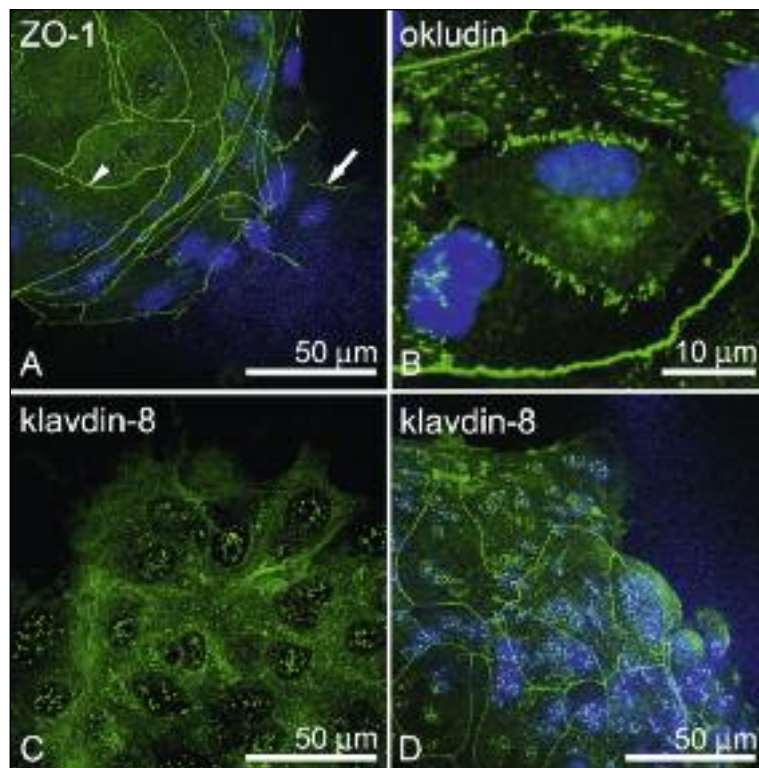
Netransformirane (normalne) celice tudi preko stikov dobivajo signale za terminalno diferenciacijo in se posledično prenehajo gibati. Ta pojav na splošno označujemo kot kontaktna inhibicija in je v povezavi z izgubo sposobnosti preraščanja celic ter posredno tudi s preprečitvijo epiteljsko-mezenhimskega prehoda. V to signaliziranje so vključene komponente tesnega stika in aktivnosti jedrnih transkripcijskih dejavnikov. Tako  $\beta$ -katenin (zbran v adherentnem in tesnem stiku) kot tudi p120 preko transkripcijskih dejavnikov in sprememb v zgradbi kromatina vplivata na izražanje genov. Tako na primer p120 zavre transkripcijske represorje (20). Gradbene komponente tesnega stika pa tudi neposredno regulirajo aktivnost transkripcijskih dejavnikov. Proteini ZO-1 se vežejo na določene transkripcijske dejavnike, zlasti v jedrih celic z nedokončno zgrajenimi tesnimi stiki, na pri-

mer med celjenjem ran (21). Podobno naj bi tudi ZO-2 vplival na transkripcijske dejavnike, torej imajo proteini ZO podobno vlogo kakor katenini.

## TESNI STIKI IN CELJENJE RAN

Tesni stiki so nujni za ponovno vzpostavitev in vzdrževanje zajezivne vloge epitelijev po poškodbi. Ob celjenju ran poteka izražanje in potovanje različnih tesnostičnih proteinov usklajeno glede na različne fiziološke ali tudi patološke dejavnike. Znano je, da se med fiziološko samoobnovo epitelijev stare, odmrle celice odstranjujejo in nadomeščajo z novimi celicami, ne da bi se pri tem spremenila funkcionalnost epiteljske pregrade (22). Poš-

kodbi različnih epitelijev (kože, črevesa, pljuč, žil, sečnega mehurja) sledi celjenje ran, pri katerem se torej kontrolirano izražajo tesnostični proteini (23). Na primer, na *in vitro* modelih večplastnih poškodb urotelija sečnega mehurja, ki mu sledi celjenje rane, je pomembno dogajanje na t.i. rastočem ali vodilnem robu. Na tem mestu sta zgodnja celična dogodka proliferacija in gibanje celic, ki ju spremlja izražanje proteinov tesnih stikov. Že v enoskladnem uroteliju so prisotni proteini ZO-1, okludin in klavdin-4, kar je predpogoj za oblikovanje funkcionalne krvno-urinske permeabilnostne pregrade (slika 5). Ker je ZO-1 le submembranski ogrodni protein, ki se povezuje z okludinom ali posameznim klavdinom, prisotnost ZO-1 torej ni



Slika 5. Izražanje in razporejanje tesnostičnih proteinov med obnovo urotelija *in vitro*. Imunofluorescenca ZO-1, okludina in klavdina-8. A – ZO-1 je prisoten na mejah med sosednjimi celicami na vodilnem robu (puščica) ter v neprekinjenih linijah na apikalno-bazolateralnih delih plazmaleme (glava puščice) površinskih celic v dvoskladnem uroteliju za vodilnim robom. B – Okludin se nahaja v neprekinjenih linijah med površinskimi celicami v dvoskladnem uroteliju in v prekinjenih linijah na mejah med bazalnimi celicami. C – Klavdin-8 v enoskladnem uroteliju na vodilnem robu ni prisoten. D – Klavdin-8 je izražen na mejah med površinskimi urotelijskimi celicami v dvo- do triskladnem uroteliju za vodilnim robom.

pogojena tudi s funkcionalnimi tesnimi stiki (24). Novejše raziskave potrjujejo, da tudi vsi klavdini niso ključni za funkcionalnost tesnih stikov. V obnavljajočem se uroteliju po poškodbi je klavdin-8 tisti, ki se izrazi nazadnje in je prisoten v tesnih stikih med diferenciranimi površinskimi urotelijskimi celicami (slika 5) (25). Predvideva se, da je v uroteliju prav klavdin-8 tisti, ki je odgovoren za izredno visoko transepitelijsko upornost.

Zanimivo je, da lahko v primerih površinskih poškodb urotelija k hitrejšemu celjenju poškodbe prispevajo tudi že obstoječe, dokončno diferencirane površinske urotelijske celice, in sicer na dva načina. Prvič, v stiku z novimi, še ne dokončno diferenciranimi površinskimi celicami razvijejo tesne stike že eno uro po poškodbi, in drugič, z zalogami apikalne plazmaleme v veziklih, shranjenih v apikalni citoplazmi, lahko povečajo površino apikalne plazmaleme celo do trikrat, s čimer zelo hitro in učinkovito prekrijejo obsežen del površinske poškodbe (26).

## TESNI STIKI IN BOLEZNI

Tesni stiki v osnovi preprečujejo izgubo tekočin iz telesa, vstop vsebine iz notranjih telesnih svetlin v telo in tudi prodiranje bakterij med celicami epitelijev globlje v telo. V določenih primerih so spremembe v zgradbi tesnega stika osnovni vzrok za nekatere bolezni. So pa stanja, kjer ni trdnih zagotovil, ali so spremembe v tesnih stikih vzrok ali posledica bolezni. Pri pojavljanju bolezni so gotovo ključni klavdini, ki so v povezavi s čisto določenimi spremembami v pregradni vlogi tesnih stikov. Mutacije klavdinov lahko namreč privedejo do specifičnih bolezni pri človeku, npr. mutacije klavdina-16 povzročajo dedno hipomagneziemijo, mutacije klavdina-14 in/ali tricolulina pa gluhost (1, 6). Mutacije klavdina-1 v večskladnih epitelijih so vzrok neonatalnega sindroma *ichthyosis sclerosis cholangitis*. Do mutacije pride v genu na 3. kromosomu (3q28-q29), ki kodira klavdin-1 in se deduje avtosomno recesivno. Bolezen se izrazi z luskvico, pojavom levkocitinih vakuol, alopecije in kroničnim jetrnim obolenjem – skleroznim holangitisom.

Za mnoge viruse in bakterije je znano, da zlorabijo spremembe tesnih stikov za vstop

v celico. Nekateri, zlasti virusi, uporabljajo tesnostične komponente kot receptorje, spet drugi spreminjajo strukturo tesnih stikov. Tako retrovirusi delujejo preko proteina JAM. Bakterija *Helicobacter pylori* pa se s proteinom CagA veže na ZO-1, Jam-A in nekatere proteine, ki določajo celično polarnost. CagA-pozitivni sevi so krivi za gastritise in adenokarcinom (27, 28). Podobno se dogaja tudi v primeru Crohnove bolezni, pri atopičnem dermatitisu ali luskavici (29, 30). Znano je, da lahko vnetni citokini, kot sta npr. tumorski nekrozni faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ali interferon  $\gamma$ , povzročijo internalizacijo tesnostičnih komponent in spremembo aktomiozinskega citoskeleta ter tako spremenijo pregradno vlogo celic. Tako tudi mutacija filagrina, ki je ključni epidermalni pregradni protein, povzroči vnetje kože in atopični dermatitis.

Tesni stiki torej ustvarjajo v telesu različne pregrade med polariziranimi celicami epitelov in endotelov. Pregradna vloga, ki jo vzdržujejo tesni stiki v epitelijih in endotelijih, je ključna za homeostatsko delovanje tkiv. Le tako zagotavljajo normalno delovanje celic in tkiv v njih in preprečujejo specifična obolenja. Nekatere teh pregrad so dandanes že dobro preučene in med pomembnejšimi so gotovo pregrada med krvjo in zrakom v pljučih, možganovino, urinom, testisi in mrežnico.

### Pregrada med krvjo in zrakom v pljučih ali alveolo-kapilarna bariera

Pregrada je nameščena v področju izmenjave plinov v pljučih. Gradijo jo tesni stiki med prevmcitici tipa 1 v alveolarnih stenah, endotelijevih celic kapilar in bazalna lamina pod celicami. Tovrstna pregrada je seveda propustna za pline, kot so kisik, ogljikov dioksid, ogljikov monoksid in mnoge druge. Pregrada je kljub izredno tanki strukturi (lahko samo 200 nm) mehansko izjemno močna, stabilna in omogoča zadovoljivo izmenjavo plinov z difuzijo. Kljub tej trdnosti pa se pri tlaku okrog 40 mmHg lahko poruši, do česar prihaja v primeru izredno povišanega krvnega tlaka.

Ker so tesni stiki neposredno vključeni v regulacijo prehajanja ionov in makromolekul tako v epitelijevih kot endotelijevih celicah, ponuja moduliranje te njihove zaporne vloge in s tem posredno tudi prepustnosti

med celicami možnost, da tako vplivamo na vnos in tudi povečamo vnos farmakoloških učinkovin kot tudi genskih vektorjev. Dihalni epitelij je neprehoden za makromolekule, ki bi vstopale z apikalne strani. Snovi, ki se uporabljajo za spreminjanje prepustnosti tesnih stikov, kot so na primer EGTA, natrijeve soli, nasičene maščobne kisline, lizofosfatidilholin, resnično povečajo prepustnost tesnega stika, vendar tudi vplivajo na mnoge proteine v tesnem stiku ter izzovejo vnetje. Za zmanjšanje vnetnega odgovora, ki ga povzročajo omenjene snovi, pa je mogoča alternativna strategija zdravljenja, in sicer preko vplivov le na določene molekule tesnega stika. Ti postopki zdravljenja ciljajo neposredno na specifične tesnostične proteine. Takšno tarčo predstavlja predvsem okludin (31). Z vplivanjem nanj se tako nudi možnost manjše toksičnosti za dihalni epitelij in doseže večji specifični odgovor.

### **Pregrada med krvjo in možganovino ali krvno-možganska bariera**

Bakteriolog Paul Ehrlich (1854–1915), ki je injiciral anilinska barvila v živali, je opazil, da ostanejo možgani neobarvani. Tako je bil Ehrlich prvi, ki je empirično opisal krvno-možgansko pregrado. Delo je nadaljeval leta 1913 njegov študent Edwin Goldmann, ki je barvilo vnesel v spinalno tekočino in opazil, da se v tem primeru možgani obarvajo, vendar ne preostalo telo. Takrat so menili, da so za pojav te pregrade odgovorne krvne žile, kajti v sistemu, ki so ga preučevali, niso opazili nobene membrane. Koncept krvno-možganske pregrade pa je dejansko bil potrjen šele leta 1960 s pomočjo presevne elektronske mikroskopije. Krvno-možganska pregrada, imenovana tudi hematencefalna pregrada, je osnovana na celični ravni v centralnem živčnem sistemu. V principu omejuje prehajanje različnim snovem in mikroorganizmom med krvjo in živčnim tkivom. Pri tem pa omogoča prehod snovi, ki so nujno potrebne za metabolno funkcijo živčnega tkiva (npr. kisik). Ta pregrada je posledica tesnih stikov med endotelijskimi celicami in centralnim živčnim sistemom. Na stičišču krvi in možganovine se povezujejo endotelijske celice in astrociti, na teh mestih se oblikujejo tesni stiki. Krv-

no-možgansko pregrado sestavlja v osnovi izjemna gostota celic, ki je nekajkrat večja kakor med endotelijskimi celicami drugod v telesu. Podaljški astrocitov (imenovani tudi glia meja) obdajajo endotelijske celice krvno-možganske pregrade in poskrbijo za izmenjavo snovi za živčne celice. Krvno-možganska bariera se loči od sorodne krvno-cerebrospinalne tekočinske bariere, ki jo določajo povezave med celicami horoidnega pleskusa.

Krvno-možganska pregrada je zelo učinkovita prepreka med krvjo in možganskim tkivom, ki ima pomembno vlogo zlasti pri varovanju možganov pred številnimi bakterijskimi okužbami. Zaradi te vloge so bakterijske okužbe možganov zelo redke, vendar pa nekateri virusi lažje kakor bakterije prehajajo to pregrado. Ker je torej le-ta zgrajena izredno trdno in tesno, se pojavljajo težave v primeru nekaterih zdravljenj, ki zahtevajo vnos protiteles. Protitelesa so namreč zelo velike molekule, ki težko prehajajo pregrado, zato so okužbe možganov povezane z zelo resnimi in hkrati težko ozdravljivimi obolenji.

Prehod krvno-možganske pregrade za potrebe vnosa terapevtskih učinkovin za zdravljenje možganskih okvar je zato v določen predel možganov zelo težaven. Terapevtske molekule in geni, ki bi lahko bili zelo učinkoviti v diagnosticiranju in zdravljenju možganskih obolenj, ne prehajajo krvno-možganske pregrade v zadostnih količinah. Zaradi tega se uporabljajo različni sistemi za vnos sestavin v možgane. Mnogi od teh obidejo pregrado (receptorsko pogojena transcitoza, intracerebralna implantacija, metode za lokalno porušenje pregrade). Zelo obetaven vnos snovi čez krvno-možgansko pregrado predstavljajo novejša tehnologija, kot je na primer nanotehnologija. Z razvojem in uporabo nanodelcev, vgrajenih v liposome, je mogoč lažji prehod čez omenjeno pregrado. Liposomi z nanodelci tako predstavljajo možnost tarčnega uničevanja celic v možganih in so potencialno uporabni pri zdravljenju možganskih tumorjev. V novejšem času pa je predlagan predvsem mehanizem prehajanja preko bariere med možgani in krvjo s pomočjo mikroveziklov.

Prenos učinkovin čez to pregrado pa vendar predstavlja eno najbolj obetavnih aplikacij nanotehnologije v klinični nevroznanosti.

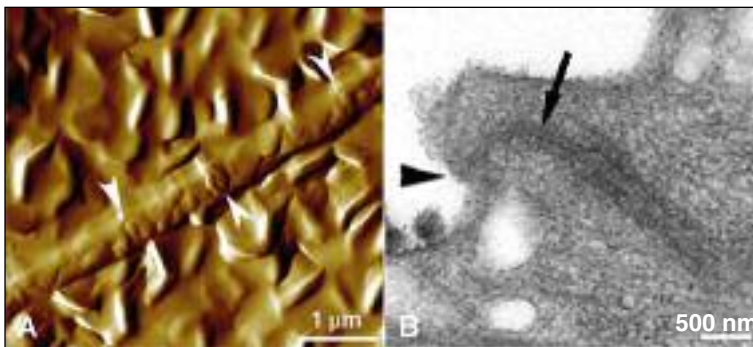
Nanodelci lahko potencialno rešujejo mnoge naloge, ki so zelo pomembne za sproščanje in prenos učinkovin čez to pregrado. Tako v novejšem času preskušajo nekatere antineoplastične učinkovine proti tumorjem centralnega živčevja, kot je tretiranje s polietilenglikolom prekrute heksadecilcianakrilatne nanokroglice, ki tarčijo in se zbirajo (poskusi pri podganah) v gliosarkomu. Vedeti pa je treba, da so žilne endotelijske celice in periciti v tumorjih pogosto abnormalni in pregrada v možganskih tumorjih ni vedno neokrnjena, tako da lahko tudi drugi dejavniki, kot so astrociti, vplivajo na odpornost možganskih tumorjev na takšna zdravljenja.

### **Pregrada med krvjo in urinom ali krvno-urinska bariera**

Tesni stiki med površinskimi urotelijskimi celicami in specializirana apikalna plazmalema površinskih celic, tako njena lipidna kot tudi proteinska sestava, zagotavljajo najmočnejšo pregrado v našem telesu, to je krvno-urinsko pregrado (32–34). Upornost urotelija je med 10.000 in celo več kot 100.000  $\Omega\text{cm}^2$ . Ocenjeno je, da tesni stiki med površinskimi urotelijskimi celicami zagotavljajo paracelično upornost, ki lahko izjemoma preseže celo vrednost 300.000  $\Omega\text{cm}^2$ . Razlog za visoko transepitelijsko upornost urotelija je predvsem v molekularni sestavi apikalne plazmaleme površinskih urotelijskih celic in v tesnih stikih. V apikalni plazmalemli so v visokem deležu prisotni transmembranski proteini

uroplakini (UPIa, UPIb, UPII, UPIII), katerih velika zunajcelična domena je razlog, da je apikalna plazmalema v površinskih urotelijskih celicah debelejša kot pri ostalih celicah. Kar v 90% je njena debelina 12 nm in le v preostalem odstotku je debelina običajnih 7 nm. Uroplakini skupaj z lipidi, ki jih najdemo tudi v mielinu, npr. sfingolipidi in holesterol, učinkovito zmanjšujejo prepustnost apikalne plazmaleme (34). Dodatno k temu prispeva tudi značilno zmanjšana apikalna endocitoza v diferenciranih površinskih urotelijskih celicah. V primerjavi z ledvičnimi epitelinimi celicami MDCK imajo površinske urotelijske celice kar 5–15-krat nižjo endocitotsko aktivnost (35). Nedavno so Kreplak in sodelavci (2007) s pomočjo mikroskopa na atomsko silo ugotovili, da k transepitelijski upornosti prispevajo tudi značilni prepleti med sosednjimi celicami (slika 6). Ti prepleti oziroma zajede ene celice v drugo (označeno s puščicami). Orientacija teh zajed se izmenično spreminja. B – Preplet (glava puščice) in nižje ležeči tesni stik (puščica) med dvema sosednjima celicama. Slikano s presevnim elektronskim mikroskopom.

S krvno-urinsko pregrado je vsebina odpadnih snovi, med katerimi so nekatere tudi toksične in potencialno kancerogene, skladiščena v svetlini sečnega mehurja do mikcije in tako varno ločena od bazolateralnega prostora, ki je izmenljiv s krvjo. Pod vplivom patogenov ali pri določenih obolenjih sečnega mehurja, kot so vnetje sečnega mehurja (cistitis), vezikouretralni refluks ali neoplastna transformacija, se na površini urotelija izpostavijo manj diferencirane celice s slabše raz-



Slika 6. Povezave med površinskimi urotelijskimi celicami. A – Z mikroskopom na atomsko silo slikane medcelične povezave, ki so vidne kot prepleti oz. zajede ene celice v drugo (označeno s puščicami). Orientacija teh zajed se izmenično spreminja. B – Preplet (glava puščice) in nižje ležeči tesni stik (puščica) med dvema sosednjima celicama. Slikano s presevnim elektronskim mikroskopom.

vitimi tesnimi stiki. V takih primerih je funkcionalnost krvno-urinske pregrade okrnjena.

Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC), ki povzroča več kot 80 % vseh okužb urinarnega trakta, se z adhezinom FimH, ki se nahaja na koncu fimbrij tipa 1, veže na UPIa na apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic. Najnovejše raziskave s krio-elektronsko mikroskopijo so pokazale, da FimH ob vezavi na receptor (UPIa) sproži zvišanje znotrajcelične koncentracije kalcija in fosforilacijo citoplazemskega repa UPIIIa, kar povzroči prerezporeditev citoskeleta in vstop bakterije v urotelijsko celico (37). Obenem UPEC na še nepoznan mehanizem povzroči prekinitve tesnih stikov. Prekinitvi tesnostičnih in tudi ostalih medceličnih vezi sledi intenzivno luščenje površinskih urotelijskih celic. To ima za posledico porušitev krvno-urinske bariere in vdor toksičnih snovi po medceličnem prostoru v globlje plasti urotelija. Takšne spremembe vodijo v nastanek vnetij, posledično sprožajo intenzivnejšo proliferacijo celic, kar lahko kasneje vodi tudi v neoplastno transformacijo. Zaradi vsega tega je krvno-urinska bariera ključnega pomena za normalno delovanje sečnega mehurja.

### **Pregrada med krvjo in testisi ali bariera med testisi in krvjo**

Oblikujejo jo tesnostične povezave med Sertoijeveimi celicami kot opornimi celicami v semenskih kanalčkih in spermatogoniji (38). Osnovni namen te bariere je preprečitev prehajanja citotoksičnih snovi (toksičnih molekul ali infekcijskih celic v testisove kanalčke). Pregrada se lahko prekinja zaradi travmatičnih dogodkov ali mehanskih poškodb testisov ali zaradi kirurškega posega – vazektomija. V primeru porušitve lahko spermiji vstopajo v krvožilje, kar izzove imunski odgovor oziroma avtoimunski odgovor. Protitelesa, usmerjena proti spermijem, se lahko vežejo na številna antigenska vezavna mesta na površini spermijev. Če se vežejo na glavico spermija, je okrnjena oploditvena sposobnost z jajčno celico. Prav tako je možnost za oploditev manjša

v primeru, če se protitelesa vežejo na rep spermija.

### **Pregrada med krvjo in mrežnico v očesu ali krvno-očesna bariera**

Pregrada med krvjo in mrežnico je del obsežne krvno-očesne bariere. Sestoji iz nefenestriranih kapilar, ki gradijo krvožilni sistem mrežnice, in tesnih stikov med retinalnimi pigmentnimi epitelijskimi celicami (39). Tako je preprečen vstop določenim snovem iz tkiv v mrežnico oziroma je preprečeno prehajanje velikih molekul iz horio-kapilarnega prepleta v mrežnico. Ta pregrada ima dve sestavni komponenti: mrežnično-vezikularni endotelij in retinalni pigmentni epitelij. V bistvu kapilare v mrežnici, ki so podobne kapilaram v možganih, vzdržujejo notranjo krvno očesno pregrado. Tesni stiki so neprehodni za številne označevalce, zaradi česar številne snovi ne morejo prehajati v očesno beločnico. V primeru sladkorne bolezni je porušena krvno-očesna pregrada, kar posledično privede do okvar oči in obolenja, imenovanega diabetična retinopatija. Rizični dejavnik predstavlja tudi povečan krvni pritisk, saj postane v tem primeru ta pregrada prepustnejša.

## **ZAKLJUČEK**

Tesni stiki so zelo pomembna vrsta povezav med celicami, saj v osnovi ločujejo naše telo od zunanosti in od notranjih telesnih votlin. Posledično vzpostavljajo in vzdržujejo mnoge pregrade v telesu in čeznje omejujejo prosto prehajanje snovem ali ga povsem preprečijo. Pregrade so pogoj za normalno delovanje celic in tkiv. Znanje o molekularni sestavi, namestitvi in vlogi tesnostičnih pregrad v telesu je dandanes že zelo temeljito. Ravno pregradna vloga stika pa hkrati predstavlja tudi težavo pri vnosu določenih učinkovin v telo. Razvijajo se pomembne nove strategije ciljnega vnosa učinkovin v telo preko tesnostične pregrade, kar že predstavlja bistven doprinos pri zdravljenju nekaterih obolenj.



## LITERATURA

1. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68: 403–29.
2. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963; 17: 375–412.
3. Fujimoto K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immuno gold labelling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci.* 1995; 108: 3443–9.
4. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998; 141: 397–408.
5. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, et al. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 2005; 171: 939–45.
6. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occludin junctions of human and flies. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 181–8.
7. Rehder D, Iden S, Nasdala I, et al. Junctional adhesion molecule-a participates in the formation of apico-basal polarity through different domains. *Exp Cell Res.* 2006; 312: 3389–403.
8. Gliki G, Ebneth K, Aurrand-Lions M, et al. Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion module C. *Nature.* 2004; 421: 320–4.
9. Scheeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol.* 2004; 286: C1213–28.
10. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* 2002; 16: 1835–7.
11. Stevenson BR, Begg DA. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDVK epithelial cells. *J Cell Sci.* 1994; 107: 367–75.
12. Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell.* 2006; 125: 535–48.
13. Vestweber D. Regulation of endothelial cell contracts during leukocyte extra vasation. *Current Opinion Cell Biol.* 2002; 14: 587–93.
14. Nelson WJ. An adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature.* 2003; 422: 766–74.
15. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 207–35.
16. Orleando RC, Lacy ER, Tobey NA, et al. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophagal epithelium. *Gastroenterology.* 1992; 102: 910–23.
17. Tsuruta D, Green KJ, Getsios S, et al. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends in Cell Biol.* 2002; 12: 355–8.
18. Schluter H, Wepf R, Moll I, et al. Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 2004; 83: 655–65.
19. Vermeer PD, Einwalter LA, Moninger TO, et al. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature.* 2003; 422: 322–6.
20. Daniel JM. Dancing in and out of the nucleus: p120 (ctm) and the transcription factor Kaiso. *Biochem Biophys Acta.* 2007; 1773: 59–68.
21. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, et al. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 10779–84.
22. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 116: 769–78.
23. Malminen M, Koivukangas V, Peltonen J, et al. Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol.* 2003; 149 (2): 255–260.
24. Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, et al. Catenins and Zonula Occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol.* 1996; 132: 451–463.
25. Kreft M, Sterle M, Jezernik K. Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125: 475–85.
26. Kreft ME, Sterle M, Veranič P, et al. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2005; 123: 529–39.
27. Krueger S, Hundertmark T, Kuster D, et al. *Helicobacter pylori* alters the distribution of ZO-1 and p120ctm in primary human gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract.* 2007; 203: 433–44.
28. Saadat I, Higashi H, Obuse C, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature.* 2007; 447: 330–3.
29. Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol.* 2006; 169: 1901–9.
30. Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22: 85–9.
31. Everett RS, Vanhook MK, Barozzi N, et al. Specific Modulation of Airway Epithelial Tight Junctions by Apical Application of an Occludin Peptide. *Mol Pharmacol.* 2006; 69: 492–500.



32. Hicks RM. The fine structure of the transitional epithelium of the rat ureter. *J Cell Biol.* 1965; 26: 25-48.
33. Jezernik K, Pipan N. Blood-urine barrier formation in mouse urinary bladder development. *Anat Rec.* 1993; 235: 533-8.
34. Hu P, Deng FM, Liang FX, et al. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *J Cell Biol.* 2002; 151 (5): 961-71.
35. Kreft ME, Romih R, Kreft M, et al. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation.* 2009; 77 (1): 48-59.
36. Kreplak L, Wang H, Aebi U, et al. Atomic force microscopy of mammalian urothelial surface. *J Mol Biol.* 2007; 374 (2): 365-73.
37. Wang H, Min G, Glockshuber R, et al. Uropathogenic *E. coli* adhesin-induced host cell receptor conformational changes: implications in transmembrane signaling transduction. *J Mol Biol.* 2009; v tisku.
38. Russell LD. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am J Anat.* 1977; 148: 313-28.
39. Vinoses SA. Assessment of blood-retinal barrier integrity. *Histol Histopathol.* 1995; 10 (1): 141-54.

Prispelo: 16. 7. 2009

Petra Hudler<sup>1</sup>

# Molekularni mehanizmi tvorbe zasevkov

## *Molecular Mechanisms of Metastasis*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** rak, zasevki, bio-označevalci

Širjenje zasevkov iz primarnega tumorja v oddaljene organe preko krvnega ali limfnega obtoka je najpogostejši vzrok smrti pri bolnikih z rakom. Molekularne in klinične študije so v zadnjem času razkrile nekatere pomembne mehanizme njihovega nastanka. Tvorba zasevkov zahteva usklajeno izražanje in delovanje številnih genov v tumorskih celicah in celicah okolnega tkiva. Vsi koraki v procesu nastajanja zasevkov (angiogeneza, prilepljanje zasevkov na stene žil, migracija, invazija in rast) igrajo pomembno vlogo v normalnih bioloških procesih, kot so razmnoževanje, embriogeneza, celjenje ran, migracija gladkih mišičnih celic in regeneracija jeter. Odkrivanje molekul in signalnih poti, ki prispevajo k tvorbi zasevkov, je ključnega pomena za razvoj diagnostičnih in napovednih testov ter za iskanje novih terapevtskih tarč za zdravljenje metastatske bolezni.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** cancer, metastases, biomarkers

The spread of metastases from a primary site through blood or the lymphatic system, which results in the establishment of secondary tumors in distant locations, is the main cause of death in cancer patients. Recent molecular and clinical studies have expanded knowledge of mechanisms implicated in metastasis formation. The development of cells with metastatic potential requires a coordinated expression and function of genes in both tumor cells and cells from surrounding tissues. All of the events involved in the metastatic cascade (i.e. angiogenesis, adhesion, migration, invasion, and growth) also play an important role in normal biological processes, such as reproduction, embryogenesis, wound healing, smooth muscle cell migration, lymphocyte trafficking and liver regeneration. The identification of molecules and signal pathways that contribute to metastasis is important for developing novel diagnostic and/or prognostic tests and for discovering novel therapeutic strategies to combat metastatic disease.

---

<sup>1</sup> Asist. dr. Petra Hudler, univ. dipl. mikrobiol., Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; petra.hudler@mf.uni-lj.si

## UVOD

Invazija rakastih celic v okoliška in oddaljena tkiva ter tvorba zasevkov sta najnevarnejši in najbolj zahrbtni posledici rakastih obolenj (1). Zasevki oziroma metastaze so rakaste celice, ki se odcepijo od tumorske mase in vstopijo v gostiteljevo okoliško tkivo oziroma v limfni ali krvni žilni sistem ter potujejo na druga mesta v telesu, kjer lahko vzpostavijo sekundarno kottišče (žarišče) raka (1, 2). Številna vprašanja o mehanizmi nastanka zasevkov, njihovem preživetju v obtoku ter sposobnosti razmnoževanja na drugotnih mestih ostajajo tudi po desetletjih raziskav še vedno nerešena.

Študije so pokazale, da lahko zasevki nastanejo zelo zgodaj v razvoju tumorjev, verjetno še pred odkritjem primarnega tumorja ter pred pojavom bolezenskih znakov (3, 4). Dogaja se tudi, da primarnega tumorja sploh nikoli ne odkrijemo, diagnosticiramo le metastatski rak neznanega izvora (5). Večinoma pa odkrijemo zasevke šele po diagnozi primarnega tumorja oziroma se ti pojavijo mesece ali celo leta po operaciji in navidezni ozdravitvi – zasevki namreč lahko po kolonizaciji novega tkiva ostanejo v obliki mikrokolonij (mikrometastaz) in se sprva sploh ne razmnožujejo in torej ne povzročajo bolezenskih znakov. Znani so primeri, ko se je metastatska oblika bolezni razvila 22 let po totalni resekciji primarnega tumorja (3).

Kljub napredku pri razvoju diagnostičnih metod, kirurškem in radiološkem zdravljenju, paliativni negi bolnikov ter izboljšanih in usmerjenih metodah zdravljenja s citostatiki (snovi, ki zavirajo celično rast in razmnoževanje) oziroma kemoterapevtiki (izraz tukaj uporabljamo za snovi, ki preprečijo razvoj in/ali uničujejo hitro deleče se celice, med katere sodijo tudi rakaste), je smrtnost bolnikov z rakom zaradi razvoja metastatske bolezni zelo visoka (6). Smrt nastopi zaradi poškodb organov, v katerih so zasevki, paraneoplastičnega sindroma (neznačilne težave, ki se pojavljajo pri nekaterih bolnikih z rakom zaradi biološko aktivnih snovi, ki jih izloča tumor) ali zaradi zapletov pri zdravljenju (1, 6). Znanstveniki ocenjujejo, da ima približno 30 % bolnikov z rakom zasevke prisotne že ob prvi diagnozi. Nadaljnjih 30–40 %

ima skrite zasevke, ki jih z današnjimi diagnostičnimi metodami ne moremo zaznati. S pomočjo kirurških posegov lahko ozdravimo manj kot tretjino novo odkritih bolnikov z rakom (1). Veliko oviro pri zdravljenju metastatske bolezni predstavlja tudi biološka raznolikost (heterogenost) metastaz, saj kljub temu, da zasevki pogosto obdržijo značilnosti matičnega tumorja, raziskave kažejo, da so v resnici genetsko drugačni od malignih celic primarnega tumorja (1, 6, 7).

Standardni klinični postopki za prepoznavanje zasevkov temeljijo na rentgenski diagnostiki, slikanju z magnetno resonanco (MRI) oziroma z računalniško tomografijo (CT), pri bolnikih s solidnimi tumorji pa si zdravniki pomagajo še z uveljavljenim klasificiranjem po sistemu TNM (angl. *T* – tumor (tumor), *N* – lymph node (bezgavka), *M* – metastasis (metastaza)) (8, 9). Zasevke lahko zdravimo kirurško, pogosteje pa z obsevanjem, kemoterapijo, biološko terapijo (oblika sistemskega zdravljenja raka z uporabo tarčnih zdravil in/ali imunomodulatorjev, ki spodbudijo naravni imunski odziv proti rakastim celicam, zmanjšujejo napredovanje raka ali ustavijo rast rakastih celic), hormonsko terapijo (oblika sistemskega zdravljenja raka z namenom zmanjšanja napredovanja raka ali kot dopolnilno zdravljenje po popolni kirurški odstranitvi tumorja) ali s kombinacijo naštetih. Kljub temu pa zasevki zelo zmanjšujejo možnost, da bi bolnik ozdravel.

Razumevanje mehanizmov, ki so odgovorni za nastanek biološke heterogenosti celic v primarnih tumorjih in razsoj rakastih celic po telesu, bi lahko vodilo do odkritja novih bioloških označevalcev zasevkov in terapevtskih tarč ter s tem omogočilo razvoj novih diagnostičnih metod in izboljšanih metod zdravljenja (3, 7).

## PROCES TVORBE ZASEVKOV

Proces tvorbe zasevkov oziroma celic z malignim potencialom je zapleten in vključuje več korakov, za katere so značilne številne interakcije med zdravimi gostiteljevimi (bolnikovimi) in tumorskimi celicami (1).

Rakaste celice v primarnih tumorjih med razmnoževanjem pridobivajo nove genetske in epigenetske (dedne spremembe v izraž-

nju genov, ki niso posledica sprememb v zapisu DNA, ampak posledica posebnih mehanizmov, kot sta metilacija DNA in preurejanje kromatina) spremembe, zato so primarni tumorji običajno heterogeni in sestavljeni iz celic z različnimi kariotipi. Te celice imajo tudi drugačne površinske označevalce, metabolne poti, encime in hitrosti rasti ter so različno občutljive na citotoksična zdravila. Nekatere šele sčasoma pridobijo lastnosti, ki jim omogočajo invazivnost, in tako se možnost nastanka zasevkov poveča (7).

Ključni koraki v patogenezi metastaz so:

1. nastanek rakastih celic, ki pospešeno rastejo, se prehranjujejo s preprosto difuzijo in tvorijo tumorsko maso (običajno manjšo od 2 mm v premeru),
2. angiogeneza – nastanek žilja, ki omogoča dovajanje hranil in kisika v rastoči tumor,
3. razraščanje tumorja – nekatere celice pridobijo lastnosti, ki jim omogočijo lokalno invazijo v okoliško tkivo bolnika,
4. intravazacija (mobilne tumorske celice lahko vstopijo preko tankostenskih venul in limfnih žil v krvni obtok) in razsoj krožečih tumorskih celic (KTC) po telesu,
5. lepljenje in razmnoževanje KTC znotraj žilne stene ter *in situ* preobrazba v mikrometastaze (metastatske lezije, manjše od 2 mm) ali v makrometastaze (metastatske lezije, večje od 2 mm),
6. ekstravazacija – KTC pogosto tudi izstopijo iz krvnega obtoka v distalna tkiva, verjetno preko podobnega mehanizma, ki je odgovoren za začetno invazijo in
7. kolonizacija distalnih tkiv in tvorba niše (omejen prostor v ali na tkivih, kjer se nahajajo metastaze) v tkivu – nastanek skupkov tumorskih celic ali mikrometastaz, ki lahko mirujejo oziroma so speče (angl. *dormant*) tudi po več let, se celo nikoli ne razvijejo v makrometastaze ali pa se zaradi določenih signalov iz mikrookolja po določenem obdobju mirovanja pretvorijo v makrometastaze in se začno razmnoževati (3, 6, 7).

Čprav pri ljudeh lahko opazujemo le zadnjo fazo zasevkov, ko je distalna lezija dovolj velika, da jo zaznamo z uveljavljenimi diagnostičnimi metodami slikanja, pa so nekateri od teh

teoretičnih korakov že bili raziskani *in vivo* v poskusnih modelih (6). Dokazano je bilo, da pri vsaki stopnji procesa nastajanja zasevkov preživi le nekaj celic (1, 6). Tako verjetno le 0,01 % KTC uspešno tvori kolonije mikrometastaz (1, 6, 10). Iz študij na modelnih živalih so raziskovalci ocenili, da se lahko iz primarnega tumorja odcepi približno  $1 \times 10^6$  celic na dan, ki vstopijo v krvni obtok. Okoli 85 % KTC se že v 5 minutah po vstopu v krvni obtok uniči v posebnem procesu apoptoze, imenovanem *anoikis* (oblika apoptoze, ki v telesu skrbi za uničenje epitelijskih celic, ki se slučajno odlučijo iz tkiva) (11). Ni znano, na kakšen način se majhen odstotek KTC temu procesu izogne (11, 12). Tudi druge študije so pokazale, da je tvorba zasevkov selektiven proces, v katerem preživijo le manjše subpopulacije tumorskih celic (1, 10).

## MOLEKULARNI MEHANIZMI INVAZIJE

Vdor rakastih celic iz primarnega tumorja v bližnje okoliško tkivo pogosto označuje tudi začetek metastatskega procesa (6). V tem procesu se morajo tumorske celice genetsko in tudi fenotipsko spremeniti, da lahko prehajajo med različnimi anatomskimi kompartmenti – lokalna invazija preko epitelijske bazalne membrane iz primarnega tumorja v okoliško tkivo, intravazacija v limfni ali krvni obtok, transport po obtoku, ustavitve v obtoku in ekstravazacija v distalna tkiva ter kolonizacija in rast v novih tkivih (2). Lokalna invazija je prvi korak v metastatskem procesu in je izredno dinamičen mehanizem, ki vključuje spremembe v interakcijah med tumorskimi celicami, interakcijah med tumorskimi celicami in obdajajočim matriksom in poleg tega še razgradnjo ter preoblikovanje ekstracelularnega matriksa (ECM) (2, 6). Pri tem morajo celice sintetizirati številne encime in druge molekule – proteaze, ki so odgovorne za razgradnjo matriksa, molekule, ki sodelujejo pri reorganizaciji citoskeleta, in druge molekule, ki omogočijo migracijo tumorskih celic (2). Vse več dokazov je, da pri tem igra ključno vlogo epitelijsko-mezehimalni prehod (angl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), ki omogoči, da tumorske celice pridobijo invazivnost in mobil-

nost (2, 6, 12). EMT je normalen celični proces, ki omogoča zgodnje razvojne (embrionalne) procese, kot je na primer razvoj mezoderma, opisan pa je tudi pri različnih fizioloških in patoloških procesih (celjenju ran, razvoju fibroze v pljučih, ledvicah in drugih organih, napredovanju malignih tumorjev in zasevanju). Pri tem epitelijske celice spremenijo svoj fenotip in se pretvorijo v mezenhimske celice, ki ne tvorijo medceličnih povezav, in so zato bolj mobilne. Normalne epitelijske celice so ključne pri vzdrževanju strukture in funkcije organov in so povezane med seboj preko celičnih stikov in preko stikov z ekstracelularnim matriksom. V celične stike so vpleteni kadherini (transmembranski proteini, ki omogočajo, da so celice v tkivih povezane med sabo), medtem ko so za stike z matriksom odgovorni predvsem integrini (receptorji na površini celic, ki omogočajo povezave med tkivnimi celicami in okoljem, ki tkivo obdaja; sodelujejo pa tudi pri celičnem signaliziranju) (12). Ti proteini so povezani še s citoskeletom znotraj celic, tako da so epitelijske celice rigidne in nemobilne. Mezenhimske celice imajo bolj sproščeno strukturo, tvorijo manj celičnih povezav, imajo manj citokeratinskih molekul in so bolj mobilne. Pri preklopu fenotipa epitelijskih celic v mezenhimske verjetno sodelujejo transkripcijski faktorji Twist, Snail, Slug in SIP1, ki jih izločajo tumorske celice in celice tumorske strome (3, 12). Omenjeni transkripcijski faktorji običajno sodelujejo pri razvojnih procesih in se v celicah odraslih le redko izražajo. Zanimivi bi lahko bili v diagnostiki, saj bi njihova prisotnost v tkivih ali serumu kazala na možnost razvoja zasevkov. Tumorska stroma je celično mikrookolje, ki obdaja tumor, in je sestavljeno iz različnih gostiteljevih celic, kot so fibroblasti, ki izločajo rastne faktorje, faktorje angiogeneze in receptorje, vnetne celice, ki izločajo kemokine, tumorje nekrotizirajoči faktor (TNF), citokine in transkripcijske faktorje, ter endotelijske in limfatične celice, ki jih privabijo izločene signalne molekule in so udeležene pri procesu tvorbe novih žil (angiogeneza) (3). Posledica njihovega delovanja je zmanjšano izražanje E-kadherina (molekule, ki sodeluje pri celičnih stikih in vzdrževanju polarosti celic), zmanjšano izražanje epitelijskih označevalcev

(citokeratinov), povečano izražanje mezenhimskih označevalcev (vimentina in N-kadherina), povečana mobilnost celic ter izguba rigidnosti – celice postanejo podobne fibroblastom in lahko se poveča izločanje proteaz in fibronektina (2, 3, 12). Nastanek KTC je torej zelo zapleten proces in pri tem se v omenjenih celicah močno spremeni profil izražanja genov, pri čemer imajo pomembno vlogo tudi celice tumorskega mikrookolja (13, 14).

## VSTOP IN PREŽIVETJE V KRVNEM OBTOKU

Mezenhimskim celicam podobne tumorske celice so zelo mobilne in lahko preko žilnega endotelija (intravazacije) vstopijo v krvni ali limfni obtok, kjer naposled krožijo. Zato rej jih v tej fazi imenujemo KTC (3). Krvni obtok je zaradi hemodinamičnih strižnih sil, prisotnosti imunskih celic in odsotnosti substrata za oprijemanje celic za KTC kruto okolje – dejstvo je, da tumorske celice rastejo le, ko so pritrjene na ustrezen medij (3, 6). Smrt celic, ki se odlepijo od podlage oziroma se v telesu odlučijo od tkiv, običajno nastopi zaradi posebnega mehanizma apoptoze, imenovane *anoikis* (6). Že v zgodnjih sedemdesetih letih prejšnjega stoletja je Fidler s sodelavci pokazal, da po vstopu v krvni obtok prvih 24 ur preživi manj kot 0,1 % radioaktivno označenih KTC (7, 15, 16). Poleg tega manj kot 0,01 % KTC uspešno tvori pljučne zasevke (7, 15, 16). Poskusi *in vitro* so pokazali, da izražanje receptorjev tirozinskih kinaz in drugih signalnih molekul omogoči metastatskim celicam preživetje in na še neznan način preprečuje *anoikis* (6).

Ob preživetju pa se morajo KTC v žilah še pritrčiti na stene. Natančni mehanizmi pritrditve sicer niso znani, ena od možnosti je, da se na KTC nespecifično vežejo koagulacijski faktorji, ki celicam omogočijo lepljenje na steno žil, druga možnost je, da se celice zaradi svoje velikosti ob prihodu v majhne kapilare ustavijo, medtem ko gre pri tretji možnosti za to, da KTC izražajo specifične molekule na površini, ki se vežejo na receptorje na endoteliju žil (6, 7). Pri slednji KTC verjetno uporabijo mehanizem, podoben tistemu, ki ga uporabljajo levkociti pri prehodu skozi žile. Endotelijski E- in P-selektini so

glikoproteini, ki običajno usmerjajo nevtrofilce in limfocite na mesto vnetja in omogočijo šibko vezavo na žilni endotelij (6, 7). Nato se tvorijo še močnejše povezave med celicami in žilnim endotelijem, ki jih posredujejo adhezijske molekule na površini celic (kadherini in integrini) (6). Pri prvi zgoraj omenjeni možnosti pa se KTC verjetno vežejo na tkivni koagulacijski faktor, fibrinogen, fibrin in trombin, zaradi česar nastane majhen strdek, ki se ustavi v kapilarah (6). KTC po vezavi na žilni endotelij lahko sprožijo krčenje endotelija (podobno kot limfociti), kar jim omogoči vezavo na subendotelij in končno prehod v nova tkiva (6, 7).

Zanimivo je tudi odkritje, da niso vse kapilare enake (6). Endotelijske celice kapilar v različnih organih izražajo namreč različne površinske proteine. Brown s sodelavci je s pomočjo fagnega prikaza (metode preučevanja proteinskih interakcij s pomočjo bakteriofagov) odkril protein metadherin, ki se izraža na površini tumorskih celic raka dojke in se selektivno veže na žilje pljuč (19). Protitelesa in siRNA (kratke molekule dvoverižne RNA, ki imajo vlogo pri uravnavanju izražanja genov) proti metadherinu so v eksperimentalnih pogojih zmanjšala tvorbo zasevkov v pljučih, kar bi lahko izkoristili pri razvoju novih zdravil za zdravljenje metastatske bolezni (19).

Rakave celice se podobno širijo tudi po limfnih žilah, in sicer lahko vstopijo vanje na podoben način, kot je opisano zgoraj, ali pa preidejo v limfne kapilare preko krvne plazme, ki difundira skozi stene kapilar v okolno tkivo (7). KTC se lahko ustavijo v bezgavkah in se začno razmnoževati, lahko pa potujejo naprej do distalnih organov.

## KOLONIZACIJA ODDALJENIH TKIV

Ko KTC vstopijo v tarčni organ in se znajdejo v novem mikrookolju, se morajo le-temu tudi prilagoditi (20). Nekatere celice zopet spremenijo fenotip, in sicer izgubijo mezenhimske lastnosti, in ponovno postanejo podobne epitelijskim. Temu mehanizmu pravimo mezenhimalni-epitelijski preklap (12). Tovrstne celice so manj mobilne in se zato lažje naselijo v novem tkivu ter zrastejo sprva v mi-

krometastaze, nato pa še v makrometastaze (2, 3). Dejstvo pa je, da je prilagoditev KTC na novo mikrookolje v distalnih tkivih dokaj neučinkovit proces. Sicer je res, da tumorji nenazadnje izločajo na milijone rakavih celic na dan, toda mikrometastaze v distalnih tkivih lahko, kot že rečeno, ostanejo speče in se sploh ne razrastejo (3, 7, 12, 20). Poskusi so pokazali, da so mikrometastaze res viabilne, vendar razlogi, zakaj se ne razmnožujejo, še niso popolnoma pojasnjeni (6).

Ena od možnosti je, da novo mikrookolje in imunski sistem nekako preprečujeta razmnoževanje (6, 7). Možno je tudi, da se pri teh celicah po preklopu v epitelijski fenotip celični cikl ustavi (7). Tretja možnost pa je, da je razraščanje mikrometastaz v makrometastaze odvisno tudi od tega, ali so mikrometastaze sposobne izločati signale, ki omogočijo angiogenezo, kar bi jim zagotovilo dovolj hranil in kisika za hitro rast (7, 10). Poskusi z inhibitorji angiogeneze so pokazali, da so zasevki ostajali v mirujočem stanju tudi zaradi ravnovesja med razmnoževanjem celic in apoptozo (21).

Mirujoči zasevki ne povzročajo bolezenskih znakov in jih z današnjimi diagnostičnimi metodami ne moremo odkriti (21).

## PATOGENEZA ZASEVKOV IN VLOGA MIKROOKOLJA ODDALJENIH ORGANOV

Večina zasevkov malignih tumorjev se razra-  
ste le v določenih organih. Tako zasevke raka  
debelega črevesa običajno najdemo v jetrih,  
pljučih in trebušni votlini, le redko v kosteh  
in koži ter nikoli v ledvicah ali mišicah (22).  
Zasevke jetrnega in rektalnega raka najdemo  
najpogosteje v pljučih, medtem ko karcinom  
dojk pogosto tvori zasevke, ki se lahko razra-  
stejo v vseh zgoraj omenjenih organih (22, 23).  
Pri večini čvrstih tumorjev (rakasto tkivo, ki  
ne vsebuje cist ali drugih tekočinskih tvorb)  
je prisotnost metastaz v bližnjih bezgavkah  
kritični prognostični dejavnik, ki napoveduje  
prisotnost oddaljenih zasevkov in slabše  
preživetje (24). Pred več kot enim stoletjem  
je kirurg Stephen Paget preučeval podatke  
o avtopsijah 735 bolnic z rakom dojke in opa-  
zil nenaključen vzorec zasevkov v visceralnih  
organih in kosteh (22). Njegova hipoteza

»seme in zemlja« (angl. *seed and soil*) trdi, da se zasevki (semena) tumorjev razširijo in razrastejo le v točno določenih organih (zemlja) in da se metastatska bolezen razvije le, če so »semena« in »zemlja« kompatibilni (10). Leta 1928 je James Ewing postavil novo hipotezo, ki je spodbujala Pagetovo, in trdil, da je razsoj tumorskih celic odvisen od mehanskih in anatomskih dejavnikov, ki jih pogojuje žilni sistem, preko katerega potujejo te celice (10, 22). Kljub temu, da njegove trditve ne razložijo pogost pojav zasevkov v možganih, kosteh in adrenalnih žlezah, ki jih napaja manjši del krvnega obtoka, je njegova hipoteza obveljala skoraj do leta 1970, ko so eksperimentalna in klinična opažanja potrdila Pagetovo hipotezo (22). Sugarbaker je ugotovil, da čeprav je razsoj zasevkov do bližnjih organov odvisen od določenih anatomskih dejavnikov krvnega in limfnega obtoka, je njihov razvoj v oddaljenih sekundarnih organih odvisen predvsem od vrste tumorja in lastnosti gostiteljskega tkiva (10, 22). Poskusi na miših so pokazali, da se KTC lahko ustavijo v številnih organih, vendar sta njihov razvoj v mikrometastaze in makrometastaze ter razmnoževanje odvisna od vrste gostiteljskega organa (10). Zanimiv dokaz o organski specifičnosti zasevkov so opazili pri poskusu, kjer so mišim v karotidno arterijo vbrizgali tumorske celice dveh melanomov, K-1735 in B16. Pri miših, ki so jim vbrizgali celice K-1735, so odkrili zasevke v parenhimu možganov, pri miših, ki so jim vbrizgali celice B16, pa v ovojnicah možganov (10).

Uvedba peritonealno-venskega obvođa (drenaža ascitesa iz trebušne votline v veno preko cevke) pri paliativnem zdravljenju malignega ascitesa pri bolnikih z rakom ovarijskega raka rastejo v trebušni votlini. Najdemo jih lahko proste v tekočini ali pa pripete na površino peritonealnih organov. Zanje je značilno, da se ne razsejejo v druge visceralne organe. Tarin s sodelavci je opazil, da se pri paliativnem zdravljenju napredovalega ovarijskega raka s peritonealno-venskim obvođom kljub temu, da se verjetno veliko tumorskih celic vrne v telo bolnika preko pljuč, redko razvijejo metastaze v pljučih in tudi drugih organih (22).

Klinične študije in opazovanja bolnikov z rakom ter raziskave, opravljene na poskusnih živalih, so potrdile, da se zasevki iz primarnega tumorja v večini primerov razširijo preko bližnjih regionalnih bezgavk, vstopijo preko limfnega obtoka v krvni in potujejo do drugih tkiv (23). Razvoj metastatske bolezni v oddaljenih organih je mestno-specifičen in odvisen od vrste primarnega tumorja, lastnosti krožečih tumorskih celic (odziva na kemotaktične faktorje in specifične rastne faktorje gostiteljskih tkiv), sposobnosti lepljenja zasevkov na celice tkiv ter tudi od mikrookolja sekundarnih organov (10, 25).

Mehanizmi, ki usmerjajo zasevke in omogočajo kolonizacijo sekundarnih tarčnih organov, so raznoliki in zaradi kompleksnosti slabo preučeni. Usmerjevalni receptorji (angl. *homing receptors*), kemokini ali kemotaktični citokini (majhni proteini, ki lahko sprožijo in usmerjajo migracijo bližnjih celic), adresini in receptorji z mestno-specifičnimi peptidnimi motivi na tarčnih organih sodelujejo pri pritrjanju zasevkov (24). Krožeče tumorske celice se odzivajo na topne kemokine iz tarčnih organov. Tako je interakcija med kemokinoma CCR7 in CCL12 pomembna pri razsoju zasevkov v bezgavke, vezava CXCR4 in CXCL12 pa je značilna pri razsoju v pljuča, jetra, kostni mozeg in možgane (24).

Adresini so ekstracelularni proteini na endoteliju venul in so ligandi za limfocite ter omogočajo prehod limfocitov preko endotelija žil v organe. Njihovo izražanje je tkivno-specifično.

Žile v organih izražajo receptorje z značilnimi peptidnimi zaporedji. Razsoj zasevkov in kolonizacija organov sta lahko odvisna od interakcij med temi proteini in proteini, ki jih izražajo krožeče tumorske celice (24).

Značilno za nekatere tumorske celice je tudi, da so sposobne priklicati celice kostnega mozga na različne predele telesa. Poleg tega tumorske signalne molekule delujejo na fibroblaste v tarčnem organu, da začno izločati fibronektin. Hematopoetske prekursorke celice iz kostnega mozga izražajo integrin  $\alpha\beta 1$ , s katerim se vežejo na fibronektin in ustvarijo skupke v organih, ki so verjetno niša za stabilizacijo krožečih tumorskih celic v tarčnem organu (26).

## Zasevki v bližnjih bezgavkah

Zasevki v bezgavkah običajno pomenijo, da se je rak razširil, in so pomemben napovedni dejavnik poteka bolezni (25). Preden lahko najdemo zasevke v bližnjih bezgavkah so le-te povečane (tumorska limfadenopatija). Celice primarnega tumorja verjetno povzročijo preoblikovanje žilnega in limfnega sistema, preden lahko vstopijo mikrometastaze v bezgavke (24). Narejene so bile številne študije, da bi odkrili značilne molekularne vzorce, s katerimi bi lahko napovedovali nastanek zasevkov v bezgavkah. O'Donnell s sodelavci je pri bolnikih z rakom glave in vratu odkril značilen vzorec 116 genov, ki so dobro napovedovali zasevke v bezgavkah (27). Trije izmed omenjenih 116 genov so bili v prejšnjih študijah povezani z agresivnim metastatskim fenotipom raka dojk in trebušne slinavke (24). Pri raziskavah malignega melanoma, raka dojk, raka želodca in pljučnega raka so odkrili povišano izražanje kemokinskih receptorjev CXCR4 in CCR7, ki sta bila pomembna označevalca razširitve raka v bezgavke. CCR7 in njegova liganda, kemokina CCL19 in CCL21, sodelujejo pri migraciji limfocitov in dendritskih celic v bezgavke (24).

## Zasevki v jetrih

Jetrni zasevki so glavni vzrok smrti bolnikov z rakom debelega črevesa, trebušne slinavke in hepatocelularnega karcinoma (25). Pri razsoju celic raka debelega črevesa so v proces vpleteni površinski glikani. Vežava malignih celic na jetrne celice je dodatno odvisna tudi od kalcija (24). Poleg tega so pri nekaterih metastatskih celicah debelega črevesa odkrili povišano izražanje tirozinske fosfatidaze PRL-3, ki je pomemben napovedni dejavnik jetrnih zasevkov. Od leta 2005 so v eksperimentalni klinični onkologiji začeli uporabljati specifično monoklonsko protitelo proti PRL-3 za določanje jetrnih zasevkov pri bolnikih z rakom debelega črevesa (25).

PDGFR- $\alpha$  in - $\beta$  sta značilni molekuli pri metastatskih celicah raka trebušne slinavke, ki le-te usmerjajo v jetra. Inhibicija receptorja PDGFR s specifičnim monoklonskim protitelom v kombinaciji z gemcitabinom (antimetabolitom, analogom pirimidina deoksicitidina, ki se veže v DNA in prepreči pom-

noževanje DNA ter celično smrt) se je izkazala kot uspešna pri zdravljenju raka trebušne slinavke in preprečevanju nastajanja zasevkov (28, 29).

V nasprotju z drugimi tkivnimi raki se zasevki hepatocelularnega raka najpogosteje naselijo kar v jetrih. Če s sodelavci je s pomočjo tkivnih bio-čipov odkril, da so si celice primarnega tumorja in zasevki zelo podobni. To je v skladu s prejšnjimi študijami, ki so pokazale, da primarni tumorji pogosto zasevajo zelo zgodaj. Druge raziskave so pokazale, da pri razsoju sodelujejo proteini, ki igrajo vlogo pri celičnih povezavah in razgradnji matriksa, kot so IL-2R, MMP-9, CD37,  $\alpha$ 9-integrin, serinska proteaza 5 in osteopontin (zunajcelični strukturni protein; organska komponenta kosti). Predvsem izražanje osteopontina je bilo v zasevkih močno povišano in njegova inhibicija je preprečila širitev zasevkov v jetra in v pljuča (25).

Jetrne celice izražajo tudi kemokin CXCL12, ki se veže z receptorji CXCR4, ki jih pogosto izražajo krožeče tumorske celice raka dojk in raka debelega črevesa (30). Manozni receptorji na jetrnem sinusoidnem endoteliju omogočajo preko oligosaharidov na njihovi površini vezavo zasevkov melanoma. Vnetni procesi v jetrih pospešijo zasevanje, ker se izloča IL-1, ki deluje na jetrni endotelij tako, da celice izražajo še več manoznih receptorjev (24). Celice nekaterih limfomov izražajo integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, ki se veže na usmerjevalni receptor na jetrnem endoteliju (VCAM-1) in je verjetno pomemben pri razsoju (31).

## Zasevki v pljučih

Pljuča so drugi najpogostejši organ, kjer najdemo zasevke. Tumorji, ki najpogosteje zasevajo v pljuča, izvirajo iz dojk, sečnega mehurja, debelega črevesa, ledvic, glave in vratu ter kože (melanom) (7).

Pljučni endotelij izraža tri proteine (LU-ECAM-1, dipeptidil peptidaza IV in membranska dipeptidaza), ki jih tumorske celice izkoriščajo za pritrjanje (32). Rakaste celice dojk, ki izražajo metadherin, se prednostno vežejo na žile pljuč in so pomemben napovedni dejavnik razsoja bolezni (19). Tudi celice karcinoma trebušne slinavke, ki izražajo posebno obliko proteina CD44, najpogosteje kolonizirajo pljuča (24). Določanje te oblike



CD44 bi lahko bilo uporabno pri odkrivanju zasevkov, saj le nekatere rakaste celice izražajo omenjen protein in le-te se običajno razvijejo v zasevke.

Študije so tudi pokazale, da proteini, ki jih izločajo pljučne celice, lahko vplivajo na pljučne zasevke, tako da postanejo le-ti odporni proti kemoterapevtikom. Wilmanns s sodelavci je naredil poskus, kjer je opazil, da so rakaste celice debelega črevesa, ki rastejo v pljučih izogonskih mišk (mišk z istim genotipom), odporne proti doksorubicinu, medtem ko so bile enake celice v koži občutljive na to zdravilo. Odpornost zasevkov v pljučih je bila verjetno pogojena s povečanim izražanjem P-glikoproteina (deluje kot črpalka, ki odstranjuje toksične snovi iz celic) v zasevkih. Povečanega izražanja tega proteina v kožnih zasevkih niso opazili (7, 33).

Celice pljuč izražajo tudi kemokin CXCL12, ki veže CXCR4, ki ga izražajo zasevki raka dojke (24). Zeelenberg s sodelavci je odkril, da tudi celice raka debelega črevesa izražajo CXCR4, vendar v zgodnjih fazah razsoja le v nizkih količinah, ko pa pridejo celice v pljuča, se izražanje tega receptorja močno poveča. To dokazuje, da tudi mikrookolje tarčnega organa vpliva na izražanje genov v krožečih tumorskih celicah (30).

### Zasevki v možganih

Možgani so zaščiteni s krvno-možgansko pregrado, za katero so značilne kapilare s tesno povezanim endotelijem, debela bazalna membrana in plast astrocitov, ki preprečujejo vstop večjih molekul (in seveda tudi celic) in ovirajo vstop hidrofилnim snovem. Tumorske celice, ki lahko vstopijo preko pregrade, imajo posebne molekularne značilnosti (24). Astrociti izločajo različne citokine in rastne faktorje ter oblikujejo možgansko mikrookolje, na katerega se morajo tumorske celice prilagoditi. Poskusi s celično linijo iz možganskih metastatskih celic raka dojke so pokazali, da se te celice močno vežejo na astrocite (25).

Nekatere tumorske celice izražajo transferinske receptorje, na katere se veže parakrina oblika transferina, kar verjetno omogoči njihovo preživetje v možganih (24). Celice malignega melanoma izražajo nevrotrofinski receptor P75NTR, na katerega se veže živčni rastni faktor NGF (nevrotrofin), ki ga izlo-

čajo astrociti. Nevrotrofini tako sodelujejo pri invaziji zasevkov in poleg tega omogočijo tudi izločanje heparanaze iz celic glije, ki razgradi ekstracelularni matriks (24, 25).

### Zasevki v kosteh

Zasevki v kosteh so najpogostejša lokalizacija raka dojke in raka prostate. Redkeje se pojavijo pri raku pljuč, maternice, sečnega mehurja, debelega črevesa, ščitnice, ledvic in pri multiplih mielomih (25). Patofiziologija kostnih zasevkov je kompleksna in vanjo so vpletene različne celične populacije (zasevki, osteoblasti, osteoklasti in endotelijske celice) in regulatorni proteini (steroidni hormoni, citokini in rastni faktorji) (7). Obstajata dve obliki kostnih zasevkov: osteoblastna vrsta, ki jo tvorijo maligne celice raka prostate, in osteoklastna vrsta zasevkov, ki jo najpogosteje tvorijo celice raka dojke (7, 24, 25). Osteoblastni zasevki sproščajo rastne faktorje, ki aktivirajo normalne osteoblaste, kar privede do zmanjšanja resorpcije in nalaganja novega kostnega tkiva (25). Določanje teh molekul v serumu ali tkivih bolnikov bi lahko bilo pomembno pri odkrivanju kostnih zasevkov. Ključne molekule, ki verjetno igrajo vlogo pri tvorbi kostnih zasevkov, so endotelin (ET-1), kostni morfogenetski proteini (angl. *bone morphogenetic proteins*, BMP), specifični antigen prostate (angl. *prostate specific antigen*, PSA), proteini signalne poti Wnt, transformirajoča faktorja  $\beta 1$  in  $\beta 2$  (angl. *transforming growth factor  $\beta 1$ ,  $\beta 2$* , TGF- $\beta 1$  in TGF- $\beta 2$ ), rastni faktor podoben insulinu (angl. *insulin-like growth factor*, IGF), fibroblastni rastni faktor (angl. *fibroblast growth factor*, FGF) in trombocitni rastni faktor (angl. *platelet-derived growth factor*, PDGF). Ti proteini delujejo tako, da pospešijo tvorbo in diferenciacijo kostnih celic v osteoblaste in pri tem deregulirajo signalne poti, ki uravnavajo normalno homeostazo kosti (7, 24, 25).

Osteoklastni zasevki povzročijo razgradnjo kostnega matriksa z metaloproteazami (25). Kostne metastaze sprožijo v osteoblastih, osteoklastih in celicah kostnega mozga signalne poti, ki vodijo v ponavljanje cikla razgradnje kostnega tkiva (7, 25). Tumorske celice izdelujejo protein, soroden paratiroidnemu hormonu (angl. *parathyroid hormone-related protein*, PTHrP), ki v osteoblastih sproži

izločanje liganda RANK (RANKL) in osteoprotegrina (OPG). Osteoblasti in stromalne celice kostnega mozga izražajo OPG, ki prepreči vezavo proteinskega kompleksa RANKL-RANK (aktivator NF- $\kappa$ B). Porušeno razmerje teh treh proteinov povzroči, da se aktivirajo osteoklasti, kar vodi do razgradnje kostnega tkiva. Pri tem se sprostito še drugi rastni faktorji (DGF, GF-beta1, FGF in IGF), ki pospešijo izločanje PTHrP in tako spodbudijo ponoven začetek cikla aktivacije osteoklastov (24).

## BIO-OZNAČEVALCI RAZSOJA PRIMARNEGA TUMORJA

Bio-označevalci so indikatorji specifičnih bioloških stanj (34). To so lahko značilni molekularni podpisi normalnih bioloških procesov ali pa molekule, ki so značilne za patofiziološke procese, kot so napredovanje bolezni, odziv na zdravljenje in remisija rakastih bolezni (35, 36). Določanje tumorskih bio-označevalcev je v pomoč pri diagnostiki raka, odkrivanju napredovanja rakave bolezni – zaznavanju zasevkov, napovedovanju poteka bolezni in pri napovedovanju ter opazovanju odzivov bolnikov na zdravljenje (34, 37). Najpogosteje določamo njihovo prisotnost v krvi in urinu, lahko pa tudi v tkivih. Običajno so to molekule, ki so na površini ali v notranjosti rakavih celic, oziroma proteini, ki jih rakave celice izločajo, in prav slednji sodijo med najbolj uporabne, saj je njihovo določanje najmanj invazivno (kri, urin) (9, 37, 38). Gledano s stališča biokemije so to membranski antigeni, encimi, hormoni, poliamini, nukleozidi in proteinski produkti onkogenov oziroma tumorje zaviralnih genov (39). Cilj raziskav na področju odkrivanja tumorskih bio-označevalcev je razviti preproste, neinvazivne diagnostične teste, ki bodo zanesljivo napovedovali tveganje, prisotnost, stadij, bodoče vedenje tumorjev, ponoven pojav bolezni ali nastanek metastaz (35).

Kljub številnim študijam in odkritju molekul, značilnih za tumorje, je v klinični uporabi razmeroma malo bio-označevalcev, saj ti žal niso popolnoma zanesljivi. Njihove pomankljivosti so predvsem nizka specifičnost in občutljivost ter slaba napovedna vrednost (40). Poleg tega se nekateri označevalci lahko tvorijo v povišanih količinah tudi pri

normalnih fizioloških stanjih, kot so nosečnost, menstruacija, laktacija in pri nemaliginih procesih, kot je na primer vnetje (39).

Molekularne bio-označevalce (proteini, DNA, RNA in metaboliti) lahko razdelimo v grobem v več skupin. Diagnostični označevalci se uporabljajo za odkrivanje bolezni. Pri raziskavah raka je zgodnje odkrivanje bolezni izredno pomembno predvsem pri preprečevanju razsoja in posledično zniževanju smrtnosti bolnikov (41). Primera teh označevalcev v klinični uporabi sta c-kit (KIT), ki se uporablja za detekcijo gastrointestinalnih stromalnih tumorjev, in PSA za diagnozo raka prostate (8, 37, 42). Prognoistični označevalci so uporabni za napovedovanje poteka bolezni in lahko podajo informacijo o možnosti nastanka zasevkov pri določenih vrstah raka (37). Poleg tega so pomembni tudi pri opazovanju odzivov bolnikov na zdravljenje (41). Označevalci, ki jih uporabljajo v kliniki, so hormonski receptorji, proteaze, označevalci angiogeneze, receptorji rastnih faktorjev (HER-2/neu) in p53 (37). Sorodna skupina označevalcev so tudi napovedovalni označevalci, ki se uporabljajo pri izbiranju različnih terapij (37). Presejalni označevalci so pomembni pri iskanju rizičnih populacij za razvoj določene vrste raka in tudi pri zgodnjem odkrivanju tumorjev (43, 44).

Prvi bio-označevalec raka je odkril leta 1847 angleški zdravnik Henry Bence Jones (40). V urinu bolnikov z multiplim mielomom je odkril albuminozno snov, ki je bila v nasprotju z normalnim albuminom občutljiva na toploto. Biokemijsko naravo Bence-Jonesovega proteina so odkrili šele stoletje kasneje, in sicer je to temperaturno občutljiv paraprotein iz monoklonskih lahkih verig  $\gamma$ -globulina, ki ga izdelujejo tumorske celice (40).

V današnjem času se v kliniki najpogosteje uporabljajo označevalci, ki jih lahko zaznamo v serumu s preprostimi imunskimi testi in/ali z zaznavanjem mRNA s pomočjo metode verižne reakcije s polimerazo v realnem času (angl. *real time polymerase chain reaction*, RT-PCR) (9). Kljub temu ti metodi nista povsem zanesljivi, saj pri prvi predstavljajo velik problem nespecifičnost protiteles, nizka koncentracija označevalcev v krvi in drugi proteini, ki so v krvi v velikih količinah in lahko motijo občutljivost metode (12, 38).

Tabela 1. Izbor najpogosteje uporabljenih tumorskih bio-označevalcev v klinični onkologiji.

Tumorski bio-označevalac	Vrsta raka	Sorodne vrste raka <sup>a</sup>
<b>Onkofetalni proteini</b>		
<i>α-fetoprotein (AFP)<sup>c</sup></i>	Hepatocelularni karcinom, neseminomski germinalni tumorji	Rak debelega črevesa, želodca, trebušne slinavke
<i>Karcinoembrionalni antigen (CEA)</i>	Rak debelega črevesa, želodca, trebušne slinavke	Rak dojke, ščitnice, pljuč, ovarijev, maternice, jeter, sečnega mehurja
<b>Hormoni</b>		
<i>Horiogonadotropin (β-HCG)</i>	Rak moda <sup>d</sup> , jajčnikov <sup>d</sup> , horiokarcinom, drugi germinalni tumorji	Rak trebušne slinavke, pljuč, sečnega mehurja, dojke, želodca, jeter, širokega črevesa
<b>Encimi</b>		
<i>Nevronska specifična enolaza (NSE)</i>	Drobnocelični rak pljuč, nevroblastom	Wilmsov tumor, melanom, rak ščitnice, ledvic, mod, trebušne slinavke
<i>Prostatična kislina fosfataza (PAP)</i>	Rak prostate	Multipli mielom
<b>Tumor spremljajoči antigeni</b>		
<i>Karcinomski antigen CA 15-3</i>	Rak dojke	Rak jajčnikov, pljuč, jeter, trebušne slinavke, prostate, želodca
<i>Karcinomski antigen CA 19-9</i>	Rak želodca, trebušne slinavke, žolčnika	Rak debelega črevesa, požiralnika, jeter
<i>Karcinomski antigen CA 125</i>	Rak jajčnikov	Rak maternice, dojke, pljuč, prostate, požiralnika, želodca, jeter, trebušne slinavke, maligni mezoteliom peritoneja
<i>Mucinski karcinomski antigen (MCA)</i>	Rak dojke (metastatska oblika)	Gastrointestinalni/ urogenitalni karcinom, rak pljuč
<i>Prostatični specifični antigen (PSA)</i>	Rak prostate	—
<b>Serumski proteini</b>		
<i>β-2 mikroglobulin</i>	Rak pljuč, dojke	Rak trebušne slinavke, debelega črevesa in danke, limfomi, kronična limfatična levkemija
<i>S-100<sup>f</sup></i>	Nevrinom, glioblastom, astrocitom, meningeom, maligni melanom	—
<i>Tiroglobulin (hTG)</i>	Folikularni in papilarni rak ščitnice	—
<b>Drugi tumorski bio-označevalci</b>		
<i>Tkivni polipeptidni antigen (TPA)</i>	Rak pljuč, sečnega mehurja, prostate, jajčnikov, jeter, trebušne slinavke, ščitnice, glave in vratu, debelega črevesa	—
<i>HER-2/neu<sup>g</sup></i>	Rak dojke	Rak pljuč, sečnega mehurja, trebušne slinavke, Wilmsov tumor

a: Vrste raka, kjer tudi lahko zaznamo povišane koncentracije bio-označevalcev v serumu.

b: Benigna obolenja, pri katerih lahko zaznamo višje koncentracije tumorskega bio-označevalca v serumu.

c: AFP (*α-fetoprotein*) je onkofetalni plazemski protein, ki se izraža v povišanih koncentracijah pri zarodkih in novorojenčkih.

d: Običajno v kombinaciji z AFP.

e: Presejalni testi za določitev rizičnih skupin žensk, pri katerih obstaja možnost za razvoj horiokarcinoma.

f: S-100 so celični proteini, vpleteni v rast celic in diferenciacijo.

g: HER-2/neu (receptor ravnega faktorja, sorodnega EGFR) se določa v tkivih bolnikov, pri spremljanju poteka zdravljenja bolnic z rakom dojke se včasih meri tudi v serumu.

Klinična uporaba	Benigna obolenja <sup>b</sup>
Diagnostika, spremljanje poteka bolezni, presejanje pred presaditvijo jeter	Virusni hepatitis, ciroza jeter, nosečnost
Določanje stadija, spremljanje uspešnosti zdravljenja, diagnostika hepatocelularnega karcinoma	Kajenje, želodčne razjede, kronična vnetna črevesna bolezen, pankreatitis, hipotiroidizem, ciroza jeter, bronhitis
Diagnostika, spremljanje poteka bolezni, presejanje <sup>a</sup>	Kajenje marihuane, redko je povečan v nosečnosti in pri ženskah v post-menopavzi
Spremljanje poteka bolezni	Benigne bolezni pljuč, normalno nastaja v nevronih
Spremljanje poteka bolezni	Benigna hiperplazija prostate, rektalni diagnostični pregledi, določena zdravila, Gaucherjeva bolezen
Spremljanje poteka bolezni	Akutni hepatitis, benigne tvorbe v dojkah, jetrih, pljučih in ledvicah, ciste na jajčnikih, redko se poveča med nosečnostjo
Spremljanje poteka bolezni	Pankreatitis, bolezni žolčnika, ciroza, akutna faza cistične fibroze
Diagnostika, spremljanje poteka bolezni, določanje stadija	Menstruacija, nosečnost, ciste na jajčnikih, endometrijoza, ciroza
Spremljanje poteka bolezni	Akutni hepatitis, ciroza, nosečnost
Spremljanje poteka bolezni, presejanje	Benigna hipertrofija prostate, prostatitis, rektalni pregled
Spremljanje poteka bolezni	Povečana sinteza zaradi delitve celic, delovanje imunskega sistema, bolezni ledvic
Spremljanje poteka bolezni	Poškodbe centralnega živčnega sistema
Spremljanje poteka bolezni	Gravesova bolezen, tiroiditis, hipertiroidizem, nosečnost, golšavost
Spremljanje poteka bolezni	Vnetni procesi, infekcije dihalnih poti, ciroza, pankreatitis, diabetes
Spremljanje uspešnosti zdravljenja	–

Problem druge pa je slaba stabilnost mRNA, možnost navzkrižne kontaminacije vzorcev, zaznavanje psevdogenov in izražanje iskanih označevalcev v drugih, normalnih celicah (9).

Klinično odobrene bio-označevalce lahko razdelimo v dve glavni skupini, rakasti in tkivno-specifični označevalci. PSA je najbolj znan tkivno-specifični tumorski označevalec, ki se uporablja v diagnostiki in zaznavanju remisije bolezni (9, 38). Kljub številnim raziskavam ta označevalec ni popolnoma zanesljiv, saj je lahko razlogov za njegovo povišanje v človeškem telesu več. Njegova koncentracija v krvi je odvisna od starosti in rase bolnika, poviša pa se tudi pri rutinskih pregledih prostate, pri benignem povečanju prostate in pri vnetjih ter infekcijah (9). Dobra lastnost PSA je, da je specifičen, in njegovo povišanje pomeni, da je nekaj s prostatato zagotovo narobe (45).

$\alpha$ -fetoprotein (AFP) je onkofetalni protein, torej protein, ki nastaja normalno le med embrionalnim razvojem. Povečane koncentracije onkofetalnih proteinov pri odraslih so običajno posledica ponovne aktivacije genov, predvsem tistih, ki nadzorujejo rast celic in so v neposredni povezavi z malignimi procesi (39). AFP je dober označevalec, ki se uporablja za spremljanje bolnikov s hepatocelularnim rakom (8, 46). Pri teh bolnikih je AFP običajno zelo povišan. Višje koncentracije tega glikoproteina zaznamo tudi pri bolnikih z neseminomskimi germinalnimi tumorji in pa bolnikih z akutnim virusnim hepatitisom, jetrno cirozo in rakom trebušne slinavke, pljuč in želodca (39).

Karcinoembrionalni antigen (angl. *carcinoembryonic antigen*, CEA) je tudi onkofetalni protein in je eden od prvih klinično odobrenih tumorskih označevalcev. Uporablja se predvsem pri spremljanju bolnikov z rakom debelega črevesa in danke po operaciji in med zdravljenjem (39, 46). Sodi med tkivno-nespecifične označevalce, saj je njegova koncentracija povečana tudi pri raku želodca, trebušne slinavke, pljuč in dojke (46). Njegova druga pomanjkljivost je, da ga lahko najdemo tudi pri bolnikih z nemalignimi obolenji, kot so vnetna črevesna bolezen, pankreatitis in določene vrste vnetnih obolenj jeter (47).

Horiogonadotropin (angl. *human chorionic gonadotropin*,  $\beta$ -HCG) je hormon in je raz-

meroma dober tkivno-specifičen tumorski označevalec (8, 46). Uporablja se ga predvsem pri spremljanju bolnikov z germinalnimi tumorji. Rahlo povišanje tega proteina lahko zasledimo tudi pri bolnikih z rakom dojke, želodca, pljuč, jeter ali širokega črevesa, vendar se ga v klinični praksi pri teh tipih raka ne uporablja za spremljanje bolnikov (39). Med hormonske tumorske označevalce sodijo še aldosteron in kortizol (tumorji nadledvične žleze), parathormon (rak dojke, rak priželjca), insulin (karcinom endokrinih celic trebušne slinavke), prolaktin (ploščatocelični ali skvamozni karcinomi in adenokarcinomi) in kalcitonin (medularni karcinomi ščitnice) (39). Najpogosteje uporabljani označevalci v klinični onkologiji so zbrani v tabeli 1.

V zadnjih nekaj letih vedno bolj uporabljajo tudi določanje receptorja ravnega faktorja, sorodnega EGFR, HER2/neu, ki je dober napovedni in prognostični označevalec (9). Pojavlja se pri približno četrtini žensk z metastatsko obliko raka dojke. Koristen je predvsem pri odločitvi zdravnikov o načinu zdravljenja bolnic, saj se HER2/neu-pozitivne oblike raka dobro odzivajo na zdravljenje s kemoterapevtikom herceptinom (Trastuzumab®). Običajno ga določajo v tkivih obolelih za rakom. V določenih primerih, na primer pri spremljanju poteka zdravljenja bolnic z rakom dojke, merijo njegovo prisotnost tudi v serumu.

Novo visokozmogljivostne molekularne tehnike kažejo, da bo potrebno pri bolnikih z rakom pregledovati po več tumorskih označevalcev hkrati, saj po desetletjih raziskav na področju raka postaja jasno, da je to heterogena in kompleksna bolezen. Zato verjetno en sam bio-označevalec ne bo nudil dovolj visoke specifičnosti in občutljivosti, temveč bo pri posameznih vrstah raka potrebno določiti po več bio-označevalcev, ki bodo imeli višjo diagnostično in napovedno vrednost (35).

## ZAKLJUČEK

Kljub napredku pri kirurškem zdravljenju primarnih neoplazij in razvoju novih, učinkovitejših zdravil, je metastatska bolezen še vedno najpogostejši vzrok smrti bolnikov z rakom. Razlogi za neuspešno zdravljenje metastatskih lezij so:

- v času, ko pri bolniku diagnosticirajo primarni tumor, so zasevki že lahko prisotni v številnih organih,
- zasevki so heterogeni in so lahko odporni proti citostatikom, biološkim zdravilom, hormonski terapiji oziroma proti zdravljenju z radioterapijo in
- zasevki so lahko v organih, kjer zdravila ne dosežejo terapevtskih koncentracij (48).

Poleg tega se za odkrivanje zasevkov uporabljajo metode, ki temeljijo na radiografiji, MRI in CT, ki pa imajo omejeno mejo resolucije (8, 9). Mikrometastaze so običajno majhne in jih s temi metodami ne moremo zaznati. Tudi klasifikacija tumorjev s pomočjo standardiziranih sistemov, ki temeljijo na

lastnostih tumorjev, na primer sistem TNM za klasifikacijo epitelijskih tumorjev, ne poda natančnih ocen o tveganju za napredovanje bolezni (9).

Identifikacija in karakterizacija molekularnih označevalcev, ki so značilni za zasevke posameznih vrst raka, bo omogočila razvoj boljših metod za napovedovanje napredovanja bolezni in tudi razvoj novih terapevtskih strategij (9, 48, 49). Poleg tega je nujno določiti tudi genetske profile heterogenih tumorjev s pomočjo novih genomskih tehnologij, kar bi omogočilo razvoj usmerjenih kombiniranih zdravil, ki bi bila najbolj učinkovita pri uničevanju različnih tumorskih celic (48).

## LITERATURA

1. Bast RC, Gansler TS, Holland JF, et al. *Cancer medicine*. 6th ed. Hamilton (ONT), Lewiston (NY): BC Decker; 2000.
2. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007; 39 (3): 305–18.
3. Jacob K, Sollier C, Jabado N. Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects. *Expert Rev Proteomics*. 2007; 4 (6): 741–56.
4. Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8 (5): 329–40.
5. Ebert M, Bračko M, Červek J. Rak neznanega izvora. *Onkologija*. 2005; 9 (1): 45–8.
6. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; 12 (8): 895–904.
7. Langley RR, Fidler IJ. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr Rev*. 2007; 28 (3): 297–321.
8. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5 (11): 845–56.
9. Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005; 42 (2): 155–96.
10. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3 (6): 453–8.
11. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res*. 2003; 63 (13): 3805–11.
12. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett*. 2007; 253 (2): 180–204.
13. Amatangelo MD, Bassi DE, Klein-Szanto AJ, et al. Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am J Pathol*. 2005; 167 (2): 475–88.
14. Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol*. 2007; Chapter 10: Unit 10.9.
15. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 1970; 45 (4): 773–82.
16. Fidler IJ, Nicolson GL. Fate of recirculating B16 melanoma metastatic variant cells in parabiotic syngeneic recipients. *J Natl Cancer Inst*. 1977; 58 (6): 1867–72.
17. Khatib AM, Auguste P, Fallavollita L, et al. Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol*. 2005; 167 (3): 749–59.
18. Khatib AM, Kontogianna M, Fallavollita L, et al. Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res*. 1999; 59 (6): 1356–61.
19. Brown DM, Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell*. 2004; 5 (4): 365–74.

20. Bockhorn M, Jain RK, Munn LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncol.* 2007; 8 (5): 444-8.
21. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995; 1 (2): 149-53.
22. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med.* 2006; 6 (4): 145-9.
23. Leong S, Christopherson RI, Baxter RC. Profiling of apoptotic changes in human breast cancer cells using SELDI-TOF mass spectrometry. *Cell Physiol Biochem.* 2007; 20 (5): 579-90.
24. Weber GF. *Molecular mechanisms of cancer.* Dordrecht: Springer-Verlag GmbH; 2007.
25. Fokas E, Engenhart-Cabillic R, Daniilidis K, et al. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26 (3-4): 705-15.
26. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005; 438 (7069): 820-7.
27. O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene.* 2005; 24 (7): 1244-51.
28. Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (17): 6534-44.
29. Zhang T, Sun HC, Xu Y, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential. *Clin Cancer Res.* 2005; 11 (24 Suppl 1): 8557-63.
30. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 2003; 63 (13): 3833-9.
31. Papadimitriou MN, Menter DG, Konstantopoulos K, et al. Integrin alpha4beta1/VCAM-1 pathway mediates primary adhesion of RAW117 lymphoma cells to hepatic sinusoidal endothelial cells under flow. *Clin Exp Metastasis.* 1999; 17 (8): 669-76.
32. Weber GF. *Molecular mechanisms of metastasis.* *Cancer Lett.* 2008; 270 (2): 181-90.
33. Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, et al. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer.* 1992; 52 (1): 98-104.
34. Faca V, Krasnoselsky A, Hanash S. Innovative proteomic approaches for cancer biomarker discovery. *Biotechniques.* 2007; 43 (3): 279, 281-3, 285.
35. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature.* 2008; 452 (7187): 571-9.
36. Lee BTK, Liew L, Lim J, et al. Candidate List of yoUr Biomarker (CLUB): A Web-based Platform to Aid Cancer Biomarker Research. *Biomarker Insights.* 2008 (3): 65-71.
37. Alaiya A, Al-Mohanna M, Linder S. Clinical cancer proteomics: promises and pitfalls. *J Proteome Res.* 2005; 4 (4): 1213-22.
38. Omenn GS. Strategies for plasma proteomic profiling of cancers. *Proteomics.* 2006; 6 (20): 5662-73.
39. Novakovic S. Tumorski označevalci v klinični onkologiji. *Radiol Oncol.* 2004; 38 (2): 73-83.
40. Polanski M, Anderson NL. A List of Candidate Cancer Biomarkers for Targeted Proteomics. *Biomarker Insights.* 2006 (2): 1-48.
41. Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer.* 2007; 6: 25.
42. Chen YR, Juan HF, Huang HC, et al. Quantitative proteomic and genomic profiling reveals metastasis-related protein expression patterns in gastric cancer cells. *J Proteome Res.* 2006; 5 (10): 2727-42.
43. Kumar S, Mohan A, Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers.* 2006; 11 (5): 385-405.
44. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93 (14): 1054-61.
45. ACS: American Cancer Society. Tumor Markers [internet]. American Cancer Society; 2010 [citirano 2009 Aug 19]. Dosegljivo na: [http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED\\_2\\_3X\\_Tumor\\_Markers.asp?sitearea=PED](http://www.cancer.org/docroot/PED/content/PED_2_3X_Tumor_Markers.asp?sitearea=PED)
46. Koepke JA. Molecular marker test standardization. *Cancer.* 1992; 69 (6 Suppl): 1578-81.
47. Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, et al. *Clinical oncology.* 3rd ed. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone; 2004.
48. Kaiser HE, Nasir A, Nasir NA. Selected aspects of cancer progression: metastasis, apoptosis and immune response. Dordrecht: Springer; 2008.
49. Kufe DW, Holland JF, Frei E, et al. *Cancer medicine.* 6th ed. Hamilton (ONT), Lewiston (NY): BC Decker; 2003.

Andreja Erman<sup>1</sup>, Kristijan Jezernik<sup>2</sup>

# Avtofagija in njena vloga v zdravju in bolezni

## *Autophagy and its Role in Health and in Sickness*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** avtofagija, razgradnja, celična smrt, bolezen

Avtofagija je kataboličen proces razgradnje celici lastnih sestavin s pomočjo lizosomov. Je močno reguliran proces, ki poteka med celično rastjo in diferenciacijo. Ima osrednjo vlogo v vzdrževanju celične homeostaze, pri čemer ohranja ravnotežje med sintezo, razgradnjo in kroženjem celičnih sestavin. Njena osnovna naloga je zaščitna, saj preprečuje kopičenje poškodovanih organelov in beljakovinskih skupkov v celici. Obenem omogoča celici preživetje v ekstremnih pogojih, kot sta stradanje ali oksidativni stres. Ločujemo med avtofagijo s šaproni, mikroavtofagijo in makroavtofagijo. V prispevku smo se osredotočili izključno na makroavtofagijo, s katero se razgrajujejo dolgožive citosolne beljakovine, organeli in celo deli jedra. Nezadostna avtofagna aktivnost je povezana s številnimi človeškimi boleznimi, kot so npr. mišična bolehnja in boleznj živčevja. Prevelika avtofagna aktivnost je za celico škodljiva, saj lahko vodi celo v celično smrt. Avtofagija predstavlja tudi obrambni mehanizem gostitelja pred okužbo z mikroorganizmi. Pomembno vlogo pa ima tudi pri nastanku in razvoju rakavih obolenj. Rakave celice za svoje preživetje bodisi sprožijo ali blokirajo avtofagijo v različnih fazah razvoja tumorja. Nova spoznanja o mehanizmi in kontroli avtofagije bodo v prihodnje lahko omogočila nove možnosti zdravljenja nekaterih bolezni, zlasti nekaterih mišičnih obolenj, boleznj živčevja in rakavih obolenj.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** autophagy, degradation, cell death, sickness

Autophagy is a catabolic process of the degradation of cellular components by lysosomal enzymes. It is essential for cellular homeostasis by maintaining the balance between the synthesis, degradation and turnover of intracellular constituents. Its primary role is cytoprotective. It protects the cells against the accumulation of damaged organelles or protein aggregates and it ensures cell survival in extreme conditions like during starvation or oxidative stress. Three major forms of autophagy are known: chaperone-mediated autophagy, microautophagy and macroautophagy. In macroautophagy, long-lived proteins, organelles and even specific nuclear regions could be eliminated. In this paper, macroautophagy is mostly in focus. Many human diseases like muscular disorders and neurodegenerative disorders appear as a consequence of autophagic malfunctioning. Excessive autophagy is cell-destructive and could lead even into autophagic (type II) programmed cell death. Autophagy participates also in cell defense against infectious disease. Autophagy has special role in cancer, where activated or inactivated benefit tumoral cells in different stages of cancer. New discoveries about mechanisms and regulation of autophagy would enable scientists to develop in future new methods for manipulating the activity of the autophagic pathway as new therapeutic tools against some diseases, particularly muscular disorders, neurodegenerative disorders and cancer.

---

<sup>1</sup> Asist. dr. Andreja Erman, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana; andreja.erman@mf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Prof. dr. Kristijan Jezernik, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana



## UVOD

Beseda avtofagija izvira iz grških besed *auto-* (sebi lasten, svoj) in *phagy* (jesti). Avtofagija je torej razgradni proces celici lastnih sestavin, ki so odvečne ali poškodovane. Te se v končnih fazah avtofagije razgradijo s pomočjo lizosomskih encimov do organskih molekul, ki jih celica lahko ponovno uporabi in tako pridobi (reciklira) nujno potrebne hranilne snovi za vzdrževanje biosintetskih reakcij. Avtofagija se je namreč med evolucijo razvila kot primarni odgovor celic na stradanje, zato v ekstremnih pogojih brez hranil celicam omogoča preživetje (1).

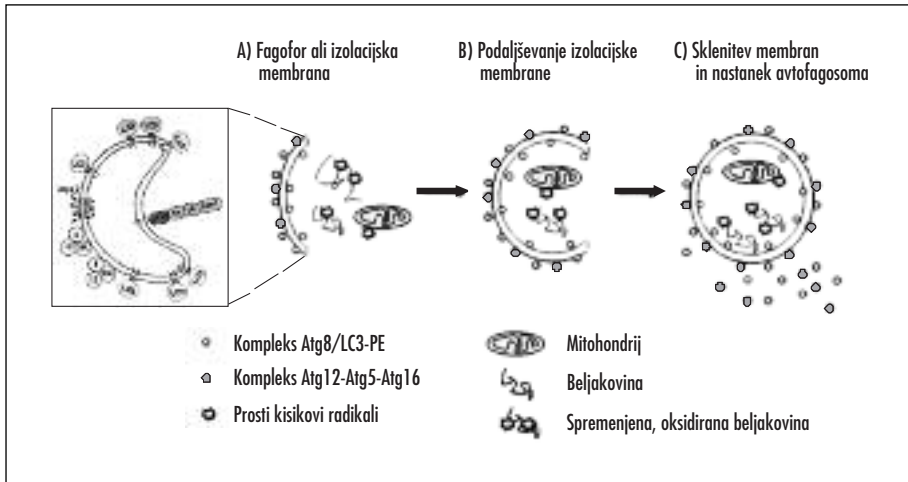
Avtofagija je natančno reguliran proces, ki ima pomembno vlogo med rastjo celice in pri ohranjanju celičnega ravnovesja (homeostaze) med sintetskimi in razgradnimi procesi, še zlasti v mišicah, jetrih in vranici (2, 3). Sprožijo jo lahko znotrajcelični signali, kot so kopičenjske poškodovanih organelov in odvečnih beljakovin v citosolu. Lahko pa so sprožitveni signali tudi zunajcelični, med njimi zlasti hipertermija, hipoksija, okužba z mikroorganizmi ali pomanjkanje hranil.

Ločujemo med avtofagijo s šaproni, mikroavtofagijo in makroavtofagijo. Vsem trem vrstam je skupna končna razgradnja celičnih sestavin v lizosomih (4). Avtofagija s šaproni (molekularskimi spremljevalci) je zelo izbirna, saj se z njo razgrajujejo le citosolne beljakovine, ki imajo specifično signalno zaporedje. Z njim se beljakovine vežejo na šapronski kompleks in prenesejo v lizosome. Mikroavtofagija je razgradnja citosolnih sestavin, ki v lizosome vstopijo z uvihanjem lizosomske membrane v notranjost lizosoma. Makroavtofagija pa je proces, v katerem se del citoplazme obda z na novo nastalo dvojno membrano in nastane avtofagosom, katerega vsebina se razgradi po združitvi z lizosomom. Z makroavtofagijo se razgrajujejo dolgožive citosolne beljakovine, celi organi in celo nekateri specifični predeli jedra. Glede na celični organel (kompartiment), ki se razgrajuje z avtofagijo, ločimo naslednje vrste makroavtofagije:

- peksofagijo (razgradnjo peroksisomov),
- mitofagijo (razgradnjo mitohondrijev) in
- ksenofagijo (razgradnjo znotrajceličnih bakterij in virusov).

Avtofagija je bila prvič opisana pred dobrih štiridesetimi leti, a so šele v zadnjem desetletju raziskave na tem področju dosegle izreden napredek z odkritjem t. i. genov Atg (angl. *autophagy-related gene*) in beljakovin Atg, ki so vključeni v proces avtofagije v celicah gliv. Za večino teh so že znani homologni geni in beljakovine tudi pri višjih evkariontih, kot so npr. *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, miš in človek (5). To potrjuje dejstvo, da je avtofagija med evolucijo ohranila svoj osnovni mehanizem in vlogo vse do danes.

Avtofagijo lahko povzročijo številni že omenjeni zunanji in notranji stresni dejavniki, ki sprožijo v celici nastajanje avtofagnih vakuol. Tvorba le-teh je kompleksen proces, za katerega še ni v celoti znan niti izvor niti mehanizem nastanka membrane avtofagne vakuole. Po začetnem sprožitvenem signalu se v citosolu izoblikuje posebna membranska struktura fagofor ali izolacijska membrana (slika 1, faza A). Ta pri glivah nastane iz t. i. pred-avtofagosomske strukture (PAS) in predstavlja začetno mesto zbiranja ter urejanja specifičnih beljakovin, ki sodelujejo pri tvorbi bodočega avtofagosoma. PAS pri sesalcih ni, zato lahko nastajajo avtofagosomi kjer koli v citosolu, medtem ko pri glivah vsi avtofagosomi nastanejo iz ene PAS (6). Tudi izvor izolacijske membrane še vedno ni dokončno pojasnjen. Ena od hipotez obravnava izolacijsko membrano kot poseben celični organel, druga hipoteza pa predvideva njen izvor iz membran endoplazemskega retikuluma, ki so brez ribosomov (8, 9). V postopnem podaljševanju izolacijske membrane, s katerim se postopno obdaja del citoplazme, namenjen razgradnji, koordinirano sodelujeta dva konjugacijska beljakovinska sistema. Prvi sistem vključuje 4 beljakovine (Atg5, Atg7, Atg10 in Atg12), med katerimi sta Atg7 in Atg10 encima (10, 11, 12). Začetni kompleksi Atg12-Atg5 se v citosolu najprej nekovalentno vežejo na beljakovine Atg16, združevanje številnih končnih kompleksov Atg12-Atg5-Atg16, vezanih na membrano, pa omogoči tvorbo membrane bodočega avtofagosoma. Drugi konjugacijski sistem predstavljajo pri glivah skupki beljakovine Atg8, ki je analogna beljakovini LC3 pri sesalcih, ter fosfatidil etanolamina (PE). Ob sprožitvi avtofagije encim Atg4 cepi LC3



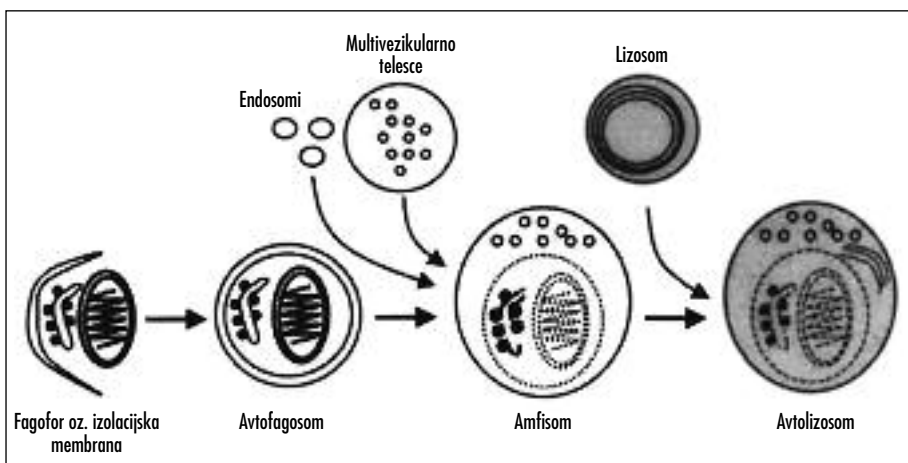
Slika 1. Shematski prikaz nastanka avtofagosoma (prirejeno po 6, 7).

in nastane najprej citosolna oblika LC3I, ki se z encimskim delovanjem Atg3 in Atg7 nato spremeni v LC3II. Ta se, povezan s PE, veže na membrano bodočega avtofagosoma (13–15). LC3 je prva identificirana beljakovina sesalcev, ki je kot LC3II lokalizirana na membranah avtofagosomov in je zato specifični označevalec avtofagnih vakuol v celici (16).

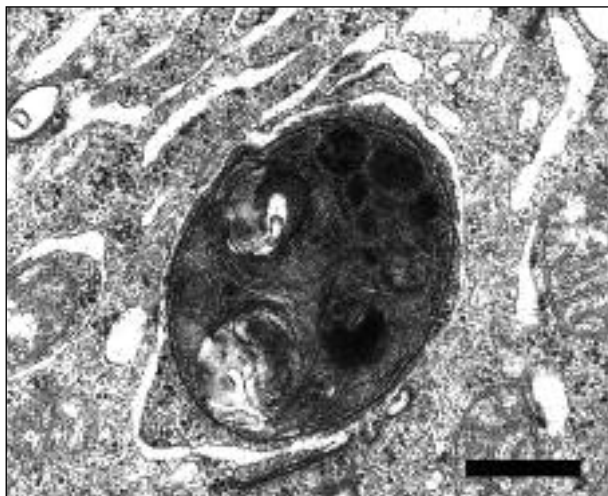
Poleg obeh beljakovinskih konjugacijskih sistemov sodelujeta pri tvorbi avtofagosoma tudi encim fosfatidilinozitol-3-fosfatna kinaza (razred III PI3K) ter kompleks iz molekul

Beclin-1 (pri glivah imenovan Atg6), Ambra (angl. *activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*), UVRAG (angl. *ultraviolet irradiation resistance-associated gene*) in Bif-1 (angl. *endophilin B1*), ki skupaj sodelujejo pri podaljševanju izolacijske membrane, tvorbi avtofagosomov in sprožitvi avtofagije (17–19).

Izolacijska membrana oz. membrana bodočega avtofagosoma se podaljšuje z dodajanjem vseh omenjenih osnovnih gradnikov, številnih kompleksov Atg12-Atg5-Atg16 in Atg8/LC3-PE ter Atg9 in lipidov (slika 1, faza B). Ko se membrana sklene, pri čemer



Slika 2. Shema nastanka in zorenja avtofagnih vakuol (prirejeno po 20).



Slika 3. Elektronska mikroskopska slika zgodnje avtofagne vakuole (avtofagosoma) v urotelijski celici sečnega mehurja miši. Merilce označuje dolžino 0,5  $\mu\text{m}$ . (Avtor mikrofografije: Andreja Erman.)

ima pomembno vlogo LC3II, nastane z dvojno membrano obdan mešiček, imenovan avtofagosom ali tudi zgodnja avtofagna vakuola (slika 1, faza C), s povprečnim premerom od 0,3  $\mu\text{m}$  do 1  $\mu\text{m}$  (15). LC3II, ki je vezan na zunanjo membrano avtofagosomov, se odcepi. LC3II, vezan na notranjo membrano, pa ostane ujet v notranjosti avtofagosoma in je zato specifičen označevalec avtofagnih vakuol, vse dokler ga ne razgradijo lizosomski encimi (20). Avtofagosom se namreč združi s primarnim lizosomom, ki vsebuje številne encime (kisle hidrolaze) za razgradnjo makromolekul ter membranske protonske črpalke za vzdrževanje nizkega pH. Ta je namreč nujen potreben za delovanje lizosomskih encimov. Z zlitjem avtofagosoma in lizosoma nastane avtolizosom. Ko se ob zlitju obeh veziklov zunanja membrana avtofagosoma združi z membrano lizosoma, se s pomočjo lizosomskih encimov začne razgradnja vsebine in notranje membrane novo nastalih avtolizosomov. Če pa se avtofagosom združi z endosomom ali multivezikularnim telescem, nastane amfiosom ali pozna avtofagna vakuola, ki šele z združitvijo z lizosomom tvori avtolizosom (slika 2).

Splošno uveljavljeni pojem avtofagna vakuola se nanaša tako na avtofagosom, amfiosom kot na avtolizosom. Vendar pa avtofago-

some obdajata dve membrani (slika 3), medtem ko so amfiosomi in avtolizosomi obdani le z eno membrano. Razgradni produkti, ki nastanejo v avtolizosomih, so osnovni gradniki polimernih organskih molekul. Ti prehajajo skozi membrano v citosol, kjer so celici lahko na voljo za ponovno uporabo.

## AVTOFAGIJA, APOPTOZA IN AVTOFAGNA CELIČNA SMRT

Avtofagija in apoptoza sta v celici natančno nadzorovana procesa, njun medsebojni odnos pa odloča o preživetju ali smrti celice. Tako se na primer v celici, ki ima le posamezne poškodovane in zato prepustne mitohondrije, lahko iz njih sprostijo v citosol signalne molekule za sprožitev apoptoze (npr. citokrom c, AIF, Smac/DIABLO). Vendar pa lahko sprožena avtofagna razgradnja poškodovanih mitohondrijev ustavi prezgodnjo apoptozo ter tako prepreči celično smrt. V hudo poškodovani celici, kjer je število poškodovanih mitohondrijev močno povečano, pa avtofagija ne zadostuje več za popravilo obsežne škode in ponovno obnovo. Celica zato sproži svojo lastno smrt. Pri tem lahko nadaljuje z avtofagno aktivnostjo vse do svojega propada ali pa sproži program apoptoze. Če le-ta iz do sedaj še neznanega vzroka v celici zataji, pa se lahko

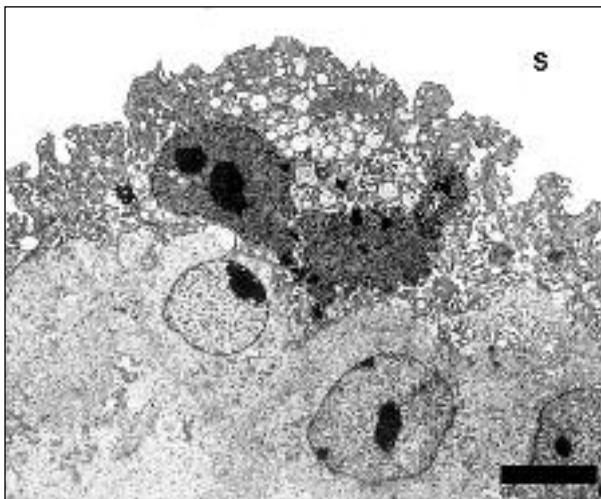
sproži posebna oblika programirane celične smrti, t. i. avtofagna celična smrt (1, 21).

Avtofagija in apoptoza nista vedno izključujoča procesa in sta lahko sočasno prisotna v isti celici (22). Glede na odnos med avtofagijo in apoptozo lahko celice razdelimo v tri kategorije. V prvi kategoriji so celice, v katerih makroavtofagija ni del celične smrti in njena sprožitev upočasni ali celo prepreči apoptozo. Z avtofagijo se namreč odstranjujejo mitohondriji s prepustno zunanjo membrano, skozi katero se lahko sprostijo signalni proteini za sprožitev apoptoze. V drugi kategoriji celic je avtofagija del apoptotskega odmiranja in se aktivira šele v zadnjih fazah apoptoze kot pomožni mehanizem odstranitve apoptotske celice. V tretji kategoriji celic pa tako avtofagija kot apoptoza potekata sočasno in skupaj prispevata k celični smrti (23).

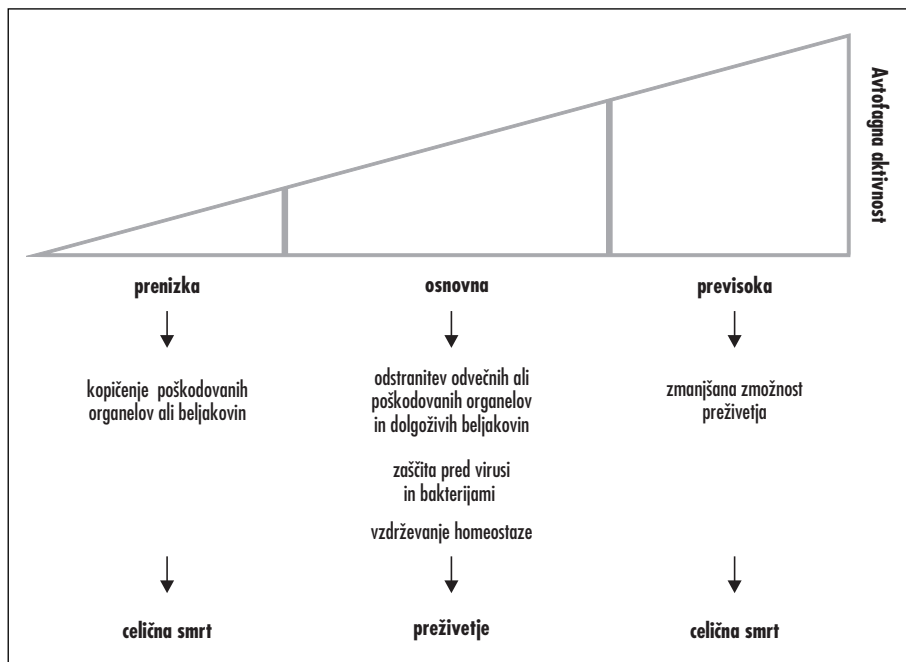
Številne raziskave v zadnjih letih so potrdile, da obstajajo molekularne povezave med avtofagijo in apoptozo. Nekatere beljakovine, npr. Bcl-2, p53 in DAP-kinaze (angl. *death-associated protein kinase*), so skupne regulatorne molekule obema procesoma. Z direktno fosforilacijo različnih substratov DAP-kinaz je možno vplivati na potek tako avtofagije kot apoptoze (24). Odkrite so tudi že nekatere beljakovine, ki aktivno sodelujejo v obeh procesih. Tako ima Atg5 kot »avtofagna beljako-

vina« tudi vlogo molekularnega »stikala« med avtofagijo in apoptozo. Ob sprožitvi apoptoze aktivirani encimi kalpaini cepijo Atg5, ki se premesti v mitohondrije, sproži sprostitve citokroma c v citosol in s tem začetek apoptoze (21, 25). Tudi Beclin-1, ki je sestavni del fosfatidilinozitol-3-kinaznega kompleksa in ki sodeluje pri nastajanju avtofagosomov, je tesno povezan z beljakovino Bcl-2, ki ima pomembno vlogo v apoptozi. Rezultati najnovejših raziskav dokazujejo vlogo Beclina-1 tako v sprožitvi avtofagije kot v zaviranju apoptoze (26, 27). Znižanje nivoja Beclina-1 pod osnovno raven namreč zmanjša avtofagijo, aktivira pa apoptozo. Ta dognanja prikazujejo Beclin-1 v novi luči kot povezovalno molekulo med avtofagijo in apoptozo.

Celice lahko umirajo na različne načine. Do nedavnega sta bila znana dva osnovna načina celičnega propadanja: nekroza in apoptoza. Nekrotska smrt, definirana kot tip III celične smrti, je patološki odgovor celice na nenadne spremembe v okolju, spremljan z vnetno reakcijo tkiva. Apoptoza, ki je tip I programirane celične smrti in je znana kot fiziološka celična smrt, pa je genetsko programiran in natančno nadzorovan proces celične smrti, ki ima odločilno vlogo v homeostazi tkiva. V zadnjih letih so znanstveniki odkrili, da lahko celice odmirajo tudi s t. i. avtofagno



Slika 4. Elektronska mikroskopska slika urotelija sečnega mehurja miši. Na svetlino (S) sečnega mehurja meji površinska urotelijska celica z morfološki značilnostmi avtofagne celične smrti. Merilce označuje dolžino 10 µm. (Avtor mikrofotografije: Andreja Erman.)



Slika 5. Shematski prikaz vloge normalne avtofagne aktivnosti v celici in posledice odstopanj (prirejeno po 30).

celično smrtjo, ki so jo označili kot tip II programirane celične smrti. Celica odmre z avtofagno celično smrtjo, kadar je makroavtofagija glavni in edini mehanizem, ki povzroči celično smrt brez prisotnih znakov celične smrti tipa I ali tipa III (23, 28). Za ta tip celične smrti je značilna razgradnja endoplazemskega retikuluma, cistern Golgijevega aparata in poliribosomov še pred razpadom jedra. V citosolu so številne avtofagne vakuole, kromatin pa je za razliko od značilne kondenzacije kromatina ob robu jedra med apoptozo kondenziran sredi jedra (slika 4).

Bistvena razlika med celično smrtjo tipa I in tipa II je v ohranjenosti citoskeleta. Med avtofagno celično smrtjo je citoskelet v celoti ohranjen, pri apoptozi pa se citoskeletni elementi razgradijo in reorganizirajo (28, 29). Aktivacija kaspaz, ki so bistveni encimi apoptoze, ter encimska razgradnja DNA, ki je ena glavnih značilnosti apoptoze, se pojavita šele v poznih fazah avtofagne celične smrti ali pa sta celo odsotni (24). Dokončne potrditve vzroka za avtofagno celično smrt še ni, zato obstaja do sedaj le več domnev. Ena od njih je, da se ta tip celične smrti sproži, kadar

se med razvojem ali v odrasli dobi pojavi potreba po obsežni odstranitvi celic iz tkiva, bodisi zaradi potrebe po preoblikovanju tkiva med razvojem ali zaradi vzdrževanja tkivne homeostaze že diferenciranega tkiva. Avtofagna celična smrt pa se pojavlja tudi v nekaterih bolnih tkivih sesalcev (npr. pri ishemičnih poškodbah srčnih mišičnih celic, v živčnih celicah oseb s Parkinsonovo boleznijo) ter v tumorskih celičnih linijah, ki so jih izpostavili kemoterapevtikom (29).

Apoptoza in avtofagna celična smrt sta zelo verjetno evolucijsko sorodna procesa, saj so odkrite nekatere skupne molekule, kot so npr. že omenjene DAP-kinaze (angl. *death-associated protein kinase*) in DRP-1-kinaze (angl. *DAPk related protein kinase-1*). Te molekule sprožijo tako brstenje plazmaleme, značilno za apoptozo, kot tudi intenzivno avtofagno aktivnost, značilno za avtofagno celično smrt (24). Dodatni dokaz so tudi nekatere celice, ki v procesu odmiranja kažejo morfološke oz. ultrastrukturne značilnosti intenzivne avtofagije, medtem ko so na molekularnem nivoju izražene značilnosti apoptoze (25). Zgolj pojav avtofagnih vakuol v citosolu celice še ni

zadosten dokaz avtofagne celične smrti. Sprožena avtofagija je lahko namreč še zadnji poskus, da celica preživi različne stresne razmere. Šele potrjene povišane koncentracije Beclina-1 in Atg5 so dokaz, da je celica res umrla zaradi avtofagne celične smrti (29).

Vloga avtofagije je za celico dejansko dvojna. Normalna avtofagna aktivnost namreč celici omogoča nemoteno delovanje in preživetje ter jo štiti pred smrtjo. Prevelika ali nezadostna avtofagna aktivnost pa postane lahko za celico zelo hitro škodljiva ali celo usodna in vodi v celično smrt (slika 5).

## AVTOFAGIJA IN STARANJE

Najpogostejša značilnost celic, ki se starajo, je kopičenje spremenjenih beljakovin in poškodovanih organelov. S staranjem celic in tkiv pride namreč do morfoloških sprememb lizosomov, sprememb v njihovi vsebini in delovanju ter sprememb v aktivnosti avtofagije (31). Učinkovitost makroavtofagije in avtofagije s šaproni s staranjem dokazano upada (32). Posledično se zato v celicah kopičijo poškodovani celični organeli, porušena je homeostaza celic in zmanjšana zmožnost učinkovite obrambe celic pred mikrobi ali zunanjimi škodljivimi vplivi. To je lahko še zlasti nevarno za diferencirane celice, ki se ne delijo več (npr. srčne mišične celice, živčne celice). Pri njih se posledice staranja prej kot pri ostalih celicah odražajo v zmanjšanem opravljanju specifičnih nalog.

Intenzivnost makroavtofagije s staranjem upada, saj je zmanjšana tako tvorba novih avtofagnih vakuol kot tudi njihovo združevanje z lizosomi (33). Zato se v celicah tkiv starih organizmov kopičijo avtofagne vakuole. Lizosomi so v takih celicah ponavadi večji in vsebujejo poleg celičnih sestavin, namenjenih razgradnji, tudi starostni pigment lipofuscin beljakovinsko-lipidne narave (34). Lipofuscin je fluorokrom in velja za glavnega označevalca staranja, saj njegova količina v celicah s staranjem skoraj linearno narašča (35). Do sedaj ni dokazov, da bi bil sam lipofuscin škodljiv za celice. Vendar pa je bilo ugotovljeno, da vakuole, polne nerazgrajenega lipofuscina, ovirajo lizosome. Na novo sintetizirani lizosomski encimi se namreč transpor-

tirajo zlasti v lizosome z lipofuscinom. Lizosomi, polni lipofuscina, neprestano dobivajo na novo sintetizirane lizosomske encime za razgradnjo nerazgradljivega lipofuscina. V avtolizosomih tako primanjkuje lizosomskih encimov, ki zato ne morejo več vzdrževati avtofagne aktivnosti na osnovnem nivoju (36). Diferencirane celice, ki se ne delijo več, sicer vsebujejo veliko lizosomskih encimov, ki pa so v napačnih organelih in zato nesposobni sodelovati v učinkoviti razgradnji celičnih sestavin. To vodi v kopičenje poškodovanih in starih mitohondrijev, ki prepuščajo ione in povzročijo nastajanje prostih kisikovih radikalov. Ti so vzrok za številne spremembe v celici (poškodbe DNA, peroksidacijo lipidov v membranah, tvorbo prečnih vezi med proteini, kopičenje membranskega lipida dolihola), za katere je znano, da v veliki meri prispevajo k staranju (37). Avtofagija torej posredno z odstranjevanjem poškodovanih mitohondrijev omejuje količino škodljivih kisikovih prostih radikalov in s tem zmanjšuje tudi t. i. oksidativni stres (tabela 1). Ta je vedno prisoten pri staranju in je tudi znan patogeni dejavnik pri številnih akutnih in kroničnih boleznih.

Omejitve vnosa kalorij v telo z dieto je do sedaj edina znana in potrjena možnost, ki upočasni staranje številnih živalskih vrst, saj zmanjša nivo krvnega sladkorja in inzulina, zaviralca avtofagije (38). Znižan nivo inzulina pa spodbudi avtofagijo, ki prepreči nastanek že omenjenih dejavnikov staranja (39, 40). Inzulinski receptor v plazmalemi celice je namreč ena ključnih molekul v regulaciji avtofagije skupaj z že omenjenim encimom fosfatidilinozitol-3-fosfatno kinazo, ki sodeluje pri tvorbi avtofagosomov (41). Študije na živalih so že potrdile možnost farmakološkega vpliva na povečanje avtofagije in s tem na možnost podaljšanja življenjske dobe. Tako so pri starih podganah, izpostavljenih dieti, z dolgotrajnim dodajanjem anti-lipolitičnih zdravil, dovoljenih tudi za uporabo pri ljudeh, znižali nivo glukoze in inzulina ter povečali avtofagno razgradnjo organelov jetrnih celic (42). Ta živalski model je tako neposredno potrdil tesno povezavo med avtofagijo in staranjem.

Tabela 1. Pozitivna in negativna vloga avtofagije pri staranju in nekaterih obolenjih (prirejeno po 38).

	Staranje	Infekcije in imunost	Živčna obolenja	Mišična obolenja	Rakava obolenja
<b>Pozitivna vloga avtofagije</b>	Odstranjuje poškodovane organele in zmanjša nastanek reaktivnih kisikovih skupin	Odstranjuje mikroorganizme med infekcijo in lahko prepreči avtoimuna in vnetna obolenja	Prepreči kopičenje spremenjenih celičnih beljakovin	Prepreči kopičenje spremenjenih celičnih beljakovin	Odstrani poškodovane organele in zmanjša kromosomska nestabilnost
<b>Negativna vloga avtofagije</b>	Dolgotrajna nezadostna razgradnja pospeši staranje	Neučinkovita za nekatere mikroorganizme	Nezadostna lizosomska razgradnja povzroči kopičenje avtofagosomov	Nezadostna avtofagija vodi v okvaro funkcije mišičnih celic	Omogoča odpornost rakavih celic na zdravljenje

## AVTOFAGIJA IN BOLEZEN

### Avtofagija in infekcijske bolezni

Patogeni mikroorganizmi so razvili številne mehanizme, ki jim omogočajo vstop in razmnoževanje v evkariotskih celicah. Avtofagija pa predstavlja uspešen obrambni mehanizem odstranjevanja mnogih bakterij (npr. *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria*), virusov in parazitov (npr. *Toxoplasma gondii*) v okuženih celicah gostitelja, saj se v fagolizosomih uničijo in razgradijo (43, 44). Vendar pa lahko nekateri znotraj-celični patogeni sami vplivajo na potek avtofagije in jo obrnejo sebi v prid s preprečitvijo zorenja fagosomov (45). Tako npr. *Brucella abortus*, *Legionella pneumophila* in *Porphyromonas gingivalis* spremenijo in prilagodijo avtofagosome v svoje zavetišče pred obrambnim mehanizmom gostitelja, vsebina avtofagosomov pa jim služi kot vir hranil (1, 44). Zgodnji endosomi zaradi vsebnosti bakterij ne zorijo, temveč se združijo z avtofagosomi in preprečijo združitev z lizosomi, ki bi povzročili razgradnjo bakterij. Legionele so pri tem še bolj »predrzne«. V avtofagosomih, ki že vsebujejo razgradne encime, se namreč uspešno razmnožujejo in ni znano, kako se zaščitijo pred zanje nevarnimi encimi. Legionele lahko celo same direktno sprožijo avtofagijo z izločanjem sekrecijskih beljakovin. Če se njihovo izločanje ustavi, avtofagija preneha in bakterije se razgradijo v fagolizosomih (46). Prav nasprotno pa velja za virus *Herpes simplex*, ki z izločanjem posebne beljakovine prepreči zanj sicer usodno aktivacijo avtofagije (47). Zanimiv način izkoriščanja avtofagije

sebi v prid ima tudi virus HIV. Ta ob okužbi celic imunskega sistema CD4<sup>+</sup> sproži intenzivno avtofagijo in apoptozo sosednjih, neokuženih celic in tako z učinkovitim zmanjšanjem števila zdravih celic CD4<sup>+</sup> povzroči oslabitev imunskega sistema ter izbruh bolezni AIDS (1).

Identifikacija bakterijskih in virusnih beljakovin, ki vplivajo na proces avtofagije, ter razumevanje njihovega delovanja bi lahko v prihodnosti omogočilo nove načine zdravljenja infekcijskih bolezni.

### Avtofagija in bolezni živčevja

Številni raziskovalci so pri mnogih nevrodegenerativnih boleznih odkrili dve skupni značilnosti okvarjenih živčnih celic, in sicer prisotnost beljakovinskih skupkov v citosolu ter spremenjeno proteolitično aktivnost celic. Tako so pri Alzheimerjevi, Huntingtonovi in Parkinsonovi bolezni zasledili velike spremembe v izgledu in aktivnosti lizosomskega sistema, ki je v možganskih nevronih sicer zelo dobro razvit (48). Te spremembe pri Alzheimerjevi bolezni vključujejo nenormalno povečano nastajanje lizosomov ter povečano sintezo vseh lizosomskih hidrolaz, vključno s katepsini. V primeru Huntingtonove bolezni se mutirana beljakovina huntingtin kopiči v jedru in citoplazmi nevronov, kar aktivira lizosomski sistem za razgradnjo huntingtina ter avtofagijo (49). Pri Parkinsonovi bolezni pa se v dopaminergičnih nevronih črne substance kopiči mutirana beljakovina  $\alpha$ -sinuklein, ki spremeni mehanizme razgradnje in poveča avtofagno aktivnost, ki lahko vodi tudi v avtofagno celično smrt ter izgubo nevronov (50).

Rezultati raziskav živčnih obolenj kažejo, da spremenjene (mutirane ali napačno zvite) beljakovine sprožijo lastno razgradnjo s pomočjo šapronov ali proteaz, kar verjetno v zgodnjih fazah živčnih obolenj zadostuje. Vendar pa postane kasneje zaradi vedno večje količine spremenjenih beljakovin razgradnja s pomočjo šapronov ali proteaz neučinkovita in edina možnost za odstranjevanje beljakovinskih skupkov je tako avtofagija. Z napredovanjem bolezni se količina beljakovinskih skupkov še povečuje, njihova zmanjšana dovzetnost za razgradnjo z lizosomskimi encimi ter povečana avtofagija pa lahko vodi celo v propad nevronov z avtofagno celično smrtjo (4).

V raziskavah, namenjenih proučevanju Huntingtonove bolezni, je znanstvenikom že uspelo na modelnih tkivih s sproženo intenzivno avtofagijo razgraditi spremenjeni huntingtin in tako preprečiti tvorbo in kopičenje skupkov huntingtina v živčnih celicah (49, 51). Aktivacija avtofagije v zgodnjih fazah razvoja živčnih obolenj bi torej v prihodnje lahko bila možna terapija teh obolenj.

### **Avtofagija in mišična obolenja**

Dedna mišična obolenja, za katera je značilno kopičenje avtofagnih vakuol v sarkoplazmi mišičnih celic, so v osnovi lizosomske bolezni (52). Med njimi je najbolj znana Danonova bolezen, ki je na kromosom X vezana vakuolarna miopatija in je trenutno najbolje raziskana bolezen iz skupine t. i. primarnih lizosomskih bolezni. Povzroči jo pomanjkanje lizosomske membranske beljakovine LAMP-2. V eni od raziskav so znanstveniki z inaktivacijo LAMP-2 v miših povzročili masivno kopičenje avtofagnih vakuol v celicah jeter, mišic in srca ter tako razvili živalski model za Danonovo bolezen. Raziskave na jetrnih celicah s primanjkljajem LAMP-2 *in vitro* pa so pokazale, da je kopičenje avtofagnih vakuol povezano z zmanjšanim obnavljanjem (vračanjem v trans Golgijevo mrežje) manozna-6-fosfatnih receptorjev za lizosomske encime (2, 53). LAMP-2 naj bi bil torej posredno ali neposredno udeležen v tem procesu. To je dokaz, da so lizosomi in z njimi povezane bolezni v tesni povezavi z avtofagijo. Identifikacija mutacij v genih, ki so odgovorni za lizosomsko-avtofagno pot, bo v prihodnosti omogočila bolj-

še razumevanje in zdravljenje mišičnih obolenj.

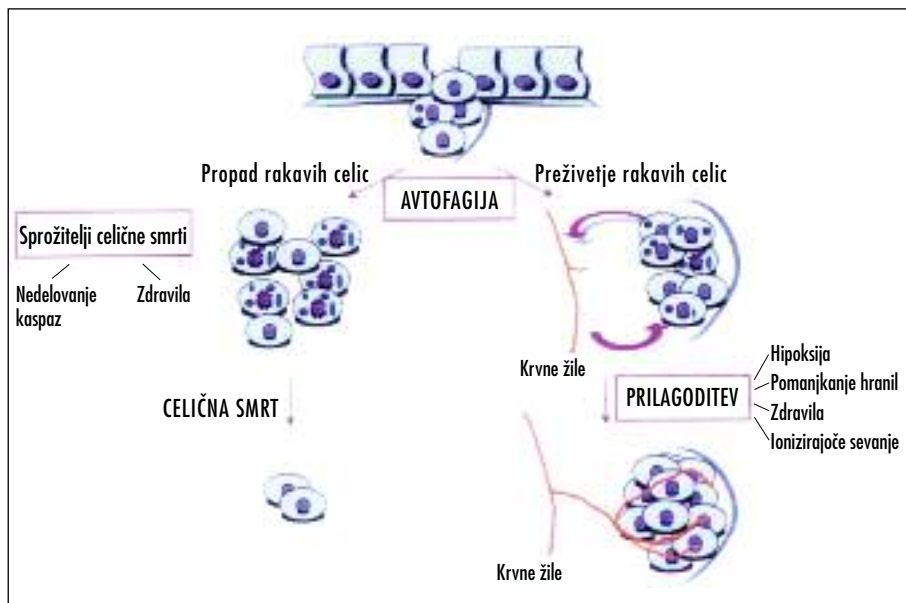
### **Avtofagija in rakava obolenja**

V rakavih celicah ima avtofagija posebno vlogo, saj tako sprožitev kot zaustavitev avtofagije omogočata preživetje teh celic. V začetnih fazah razvoja tumorjev je program avtofagije blokiran. Sinteza beljakovin prevladuje nad razgradnjo in celice hitro in nemoteno rastejo, kar je ena od osnovnih značilnosti rakavih celic. Z nadaljnjo rastjo solidnega in slabo prekrvavljene tumorja pa imajo celice v notranjosti tumorja omejen dostop do hranil in kisika, zato preklopijo iz anabolnega metabolizma v katabolni metabolizem in aktivirajo avtofagijo, da bi lahko preživele v ekstremnih pogojih (4). Dodatno prednost v boju za preživetje in s tem tudi večjo odpornost na zdravljenje daje avtofagija tumorskim celicam tudi v primeru obsevanja ali kemoterapije, saj lahko z avtofagijo celice odstranjujejo svoje poškodovane organele (54, 55).

Avtofagija torej pomembno prispeva k prilagajanju rakavih celic na razmere v okolju in s tem na njihovo preživetje. Lahko pa sodeluje tudi pri njihovem propadu, ko se zaradi različnih sprožiteljev celične smrti, npr. nedelovanja kaspaz ali delovanja zdravil (npr. Tamoxifena, Resveratrola, Rapamicina), sproži v njih avtofagno celična smrt (slika 6) (55, 56). To so že potrdile številne raziskave rakavih tkiv debelega črevesa, prostate, dojke in možganov, kjer so bile zaradi terapije, ki sproži avtofagijo, odkrite celice, ki so odmrle z avtofagno celično smrtjo (57). V zadnjih letih se z intenzivnim iskanjem možnosti neposrednega vpliva na sprožitev avtofagije v rakavih celicah in s tem na njihovo smrt nakazujejo nekatere obetavne možnosti zdravljenja rakavih obolenj v prihodnosti (58).

Beclin-1 je edini doslej znan tumorski zaviralni gen (genski lokus na kromosomu je 17q21), ki sodeluje v tvorbi avtofagosomov. Nezadostno izražanje Beclina-1 vodi v zmanjšano avtofagno aktivnost ter s tem v zmanjšano odstranjevanje poškodovanih organelov, zlasti mitohondrijev. Poškodbe in posledična prepustnost membran teh organelov so vzrok za sprostitve reaktivnih kisikovih prostih radikalov v citosol in v jedro. V njem povzročijo spremembe v genomu, ki lahko prispe-





Slika 6. Shematski prikaz različne usode rakavih celic zaradi dvojne vloge avtofagije med rasto tumorja (prirejeno po 55).

vajo k rakasti transformaciji celic (1, 47, 59). Monoalelna delecija Beclina-1 so odkrili v 40–75% primerov rakavih obolenj pljuč, dojke, jajcevodov in prostate. V teh primerih sprožitev avtofagije v rakavih celicah zaradi premajhne količine Beclina-1 ni bila možna (47).

## ZAKLJUČEK

Z odkritjem genov oz. beljakovin, ki sodelujejo v procesu avtofagije, ter s proučevanjem posledic mutacij teh genov so se razkrile do nedavnega neznane povezave med avtofagijo in apoptozo ter med avtofagijo in nekaterimi že omenjenimi bolezenskimi spremembami. Kljub temu pa ostaja še veliko odprtih vprašanj. Tako na primer še vedno ni znan odgovor na eno ključnih vprašanj, kateri meha-

nizmi omogočajo, da se npr. poškodovani mitohondriji izolirajo in razgradijo, medtem ko se nepoškodovani mitohondriji v neposredni bližini temu izognejo. Pojasnitev tega vprašanja bo odprla nove razsežnosti tudi v obravnavanju oksidativnega stresa, kjer imajo ti organeli odločilno vlogo. Prav tako tudi še ni znano, kako je medsebojna interakcija med različnimi vrstami avtofagije spremenjena v celicah obolelega tkiva ali v rakavih celicah oziroma do kakšne mere lahko npr. mikroavtofagija nadomesti zmanjšanje makroavtofagije v procesu staranja.

Raziskave avtofagije so v polnem razmahu, saj bodo nova spoznanja lahko prispevala k razvoju novih metod zdravljenja rakavih, živčnih in mišičnih obolenj, kjer ima avtofagija dokazano pomembno vlogo.

## LITERATURA

1. Deretic V, Klionsky DJ. How cells clean house. *Sci Am.* 2008; 298 (5): 74–81.
2. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 2000; 406 (6798): 902–6.
3. Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 2003; 13 (3): 137–45.

4. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 2004; 14 (2): 70–7.
5. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003; 5 (4): 539–45.
6. Longatti A, Tooze SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 956–65.
7. Vellai T. Autophagy genes and ageing. *Cell Death Differ.* 2009; 16: 94–102.
8. Dunn Jr WA. Autophagy and related mechanisms of lysosomal-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 1994; 4 (4): 139–43.
9. Reunanen H, Punnonen EL, Hirsimäki P. Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. A cytochemical study on the origin of membranes. *Histochem.* 1985; 83 (6): 513–7.
10. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 1998; 395: 395–8.
11. Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* 1999; 18 (14): 3888–96.
12. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 152 (4): 657–68.
13. Tanida I, Ueno T, Kominami E, et al. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36 (12): 2503–18.
14. Wu J, Dang Y, Su W, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B- two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339 (1): 437–42.
15. Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ.* 2009; 16 (1): 70–8.
16. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localised in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19 (21): 5720–8.
17. Petiot A, Ougier-Denis E, Blommaert EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem.* 2000; 275 (2): 992–8.
18. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1142–51.
19. Peplowska K, Cabrera M, Ungermann C. UVRAG reveals its second nature. *Nature Cell Biol.* 2008; 10 (7): 759–61.
20. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy.* 2005; 1 (1): 1–10.
21. Lemasters JJ, Qian T, Elmore SP, et al. Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic cell killing, apoptosis and autophagy. *Biofactors.* 1998; 8 (3–4): 283–5.
22. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biol.* 2006; 8 (10): 1124–32.
23. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, et al. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 2009; 16 (1): 12–20.
24. Inbal B, Bialik S, Sabanay I, et al. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol.* 2002; 157 (3): 455–68.
25. Paglin S, Hollister T, Delohery T, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001; 61: 439–44.
26. Wang J. Beclin1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation. *Autophagy.* 2008; 4 (7): 947–8.
27. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol.* 2007; 8: 741–52.
28. Bursch W, Ellinger A, Gerner CH, et al. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD or others? *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 926: 1–12.
29. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005; 115 (10): 2679–88.
30. Yousefi S, Simon HU. Apoptosis regulation by autophagy gene 5. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007; 63 (3): 241–4.
31. Cuervo AM, Dice JF. When lysosomes get old. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 119–31.
32. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2000; 275: 31505–13.
33. Terman A. The effect of age on formation and elimination of autophagic vacuoles in mouse hepatocytes. *Gerontology.* 1995; 41 (2): 319–26.
34. Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS.* 1998; 106 (2): 165–76.
35. Nakano M, Gotoh S. Accumulation of cardiac lipofuscin depends on metabolic rate of mammals. *J Gerontol.* 1992; 47: B126–9.
36. Terman A, Dalen H, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show decreased survival time and diminished autophagocytosis during aminoacid starvation. *Exp Gerontol.* 1999; 34 (8): 943–57.
37. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1271: 165–70.
38. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451 (7182): 1069–75.

39. Bergamini E, Gori Z. Towards an understanding of the biological mechanism of dietary restriction: a signal transduction theory of aging. *Aging Clin Exp Res.* 1995; 473-5.
40. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, et al. The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed & Pharmacotherapy.* 2003; 57 (5-6): 302-8.
41. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci.* 2005; 118 (1): 7-18.
42. Locci Cubeddu T, Masiello P, Pollera M, et al. Effects of antilipolytic agents on rat liver peroxisomes and peroxisomal oxidative activities. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 839: 96-104.
43. Taloczy Z, Jiang W, Virgin HW 4th, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99 (1): 190-5.
44. Scott CC, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol.* 2003; 193: 137-52.
45. Dorn BR, Dunn WA, Progulskie-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway. *Cell Microbiol.* 2002; 4 (1): 1-10.
46. Coers J, Kagan JC, Mathews M, et al. Identification of icm protein complexes that play distinct roles in biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol.* 2000; 38 (4): 719-36.
47. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin-1. *Nature.* 1999; 402 (6762): 672-6.
48. Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochem Res.* 2000; 25 (9-10): 1161-72.
49. Kegel KB, Kim M, Sapp E, et al. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci.* 2000; 20 (19): 7268-78.
50. Stefanis L, Karsen KE, Rideour HJ, et al. Expression of A53T mutant but not wild-type  $\alpha$ -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci.* 2001; 21 (24): 9549-60.
51. Qin ZH, Wang Y, Kegel KB, et al. Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet.* 2003; 12 (24): 3231-44.
52. Nishino I. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2003; 3 (1): 64-9.
53. Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 3355-68.
54. Aita VM, Liang XH, Murty VVVS, et al. Cloning and genomic organization of Beclin-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 1999; 59 (1): 59-65.
55. Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1603 (2): 113-28.
56. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin1 beta-converting enzyme like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93 (25): 14559-63.
57. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature Rev Cancer.* 2005; 5 (9): 726-34.
58. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 1999; 6 (6): 508-15.
59. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature.* 2004; 6: 1221-8.

Prispelo 21. 8. 2009

Jože Vogelnik<sup>1</sup>, Vojko Didanovič<sup>2</sup>, Andrej A. Kansky<sup>3</sup>

# Zlom obraznih kosti z ogrožajočim podkožnim emfizemom vratu in pnevmomediastinomom

*Subcutaneous Emphysema of the Neck and Pneumomediastinum Following Isolated Facial Trauma*

---

## IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** pnevmomediastinum, obrazna poškodba, dihalna stiska

Poškodbeni pnevmomediastinum je običajno povezan s topo ali penetrantno poškodbo vratu, prsnega koša ali trebušnih organov. Podkožni emfizem vratu in pnevmomediastinum, ki je povezan samo z obrazno poškodbo, ne pa tudi s poškodbo vratu, prsnega koša ali trebuha, je zelo redek. V literaturi je opisanih le nekaj primerov pnevmomediastinuma zaradi izolirane obrazne poškodbe. Predstavljen bo klinični primer podkožnega emfizema vratu in pnevmomediastinuma po izolirani obrazni poškodbi, anatomske mehanizmi poškodbe, diagnostika in zdravljenje.

---

## ABSTRACT

**KEY WORDS:** pneumomediastinum, facial trauma, upper airway emergency

Traumatic pneumomediastinum is usually caused by severe thoracic injury, resulting in blunt or penetrating neck, chest or abdominal trauma. Subcutaneous emphysema of the neck and pneumomediastinum following facial trauma in the absence of neck, chest or abdominal injuries is a rare entity. There are only a few cases in the medical literature of a pneumomediastinum following isolated facial trauma. A case report of cervical subcutaneous emphysema and pneumomediastinum secondary to isolated facial trauma is presented. The anatomic mechanism of injury, diagnosis and treatment modalities are discussed.

---

<sup>1</sup> Jože Vogelnik, dr. dent. med., Klinični oddelek za maksilofacialno in oralno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Hrvatski trg 6, 1000 Ljubljana; joze.vogelnik@guest.arnes.si

<sup>2</sup> Vojko Didanovič, dr. med., Klinični oddelek za maksilofacialno in oralno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Hrvatski trg 6, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Doc. dr. Andrej A. Kansky, dr. dent. med., Klinični oddelek za maksilofacialno in oralno kirurgijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Hrvatski trg 6, 1000 Ljubljana

## UVOD

Pnevmomediastinum (PM), poimenovan tudi medpljučni (mediastinalni) emfizem ali Hammanov sindrom, je opredeljen kot prisotnost zraka ali plina znotraj fascialnih prostorov medpljučja (1–3). PM je prvič opisal Laënnec leta 1827 kot interlobularni emfizem (1). Poškodbeni PM je največkrat sekundarni pojav, ki sledi težki poškodbi prsnega koša s predrtem sapnika, sapnic, grla, žrela, požiralnika ali trebušnih organov. Prosti zrak znotraj tkiv se širi navzgor preko vratno-medpljučnih povezav ter povzroči vratni in obrazni emfizem. Obraten pojav, pri katerem se PM razvije iz obraznovratnega emfizema zaradi izolirane obrazne poškodbe, je v literaturi opisan le nekajkrat (1, 2, 4). Prikazali bomo klinični primer, pri katerem je zlomu obraznih kosti sledil podkožni emfizem vratu in PM.

## PRIKAZ KLINIČNEGA PRIMERA

Triinštiridesetletni bolnik se je poškodoval ob padcu s kolesom, pri čemer je utrpel poškodbe

obraza in vratu. Bolnika so najprej pregledali v Urgentnem kirurškem bloku Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Opazili so obojestranski periorbitalni hematomi z razpočno rano na čelu, korenu nosu in zgornji ustnici ter odrgnino na bradi, patološko pomičnost parasimfizealnega dela spodnje čeljusti, boleč spremenjen ugriz in zlomljen zob 41. Nasičenost krvi brez dodatnega kisika je bila 95 %. Bolniku so odvzeli kri za ustrezne preiskave (hemogram, testi strjevanja krvi) in naredili osnovne rentgenske slike (glava, nos, glava v Watersovi projekciji, spodnja čeljust, vratna hrbtenica) ter konziliarno poklicali dežurnega maksilofacialnega kirurga. Ta je odredil CT obraznih kosti, ob pregledu bolnika pa zatipal krepitacije zraka na vratu in pod kožo obraza. CT je pokazal obojestranski periorbitalni edem, ki je segal v lice in navzgor frontalno, podkožni emfizem, ki je segal v obe orbiti in navzdol proti spodnji čeljusti (slika 1), večkratni zlom telesa spodnje čeljusti desno paramedialno, prečni frontobazalni zlom medialno, ki je segal v sitko, poko zgornjega orbitalnega roba brez premi-



Slika 1. Koronalni rez na računalniškotomografskih posnetkih kaže obsežne kolekcije zraka v podkožju glave in vratu (označene s puščicami).



Slika 2. Pooperativni rentgenski posnetek kaže stanje po kirurški oskrbi zlomov obraznih kosti.

ka in obojestranski zlom zgornje čeljusti z jasnim levostranskim vtisnjenjem ter izlivom v obnosne votline.

Zaradi otekanja (emfizema) vratu je otorinolaringolog opravil direktoskopijo, ugotovil hematoma leve gasilke, skelet grla je bil

čvrst, izključil je poškodbo sapnika in glavnih sapnic. Ker se je stanje slabšalo, vrat čedalje bolj otekal, bolnik vse težje dihal in začel hripavo govoriti, in ker se je pojavil inspiratorni stridor, kar je nakazovalo možen razvoj dihalne stiske, je bila potrebna urgentna traheotomija.



Slika 3. Pooperativni rentgenski posnetek kaže stanje po kirurški oskrbi zlomov obraznih kosti.



Slika 4. Na računalniškotomografskih posnetkih vratu je na aksialnih rezih videti zrak v mehkih tkivih spodnjega dela vratu (označen s puščicami).



Slika 5. Aksialni rezji skozi zgornje medpljučje kažejo zrak v zgornjem medpljučju in presternalno (označen s puščicami).



Slika 6. Poškodovanec v obdobju okrevanja. Oteklina obraza in vratu se je zmanjšala, vidna je traheotomijska rana.

Po posegu narejen CT grla ni potrdil popoškodbenih sprememb v področju mehkih struktur vratu, podjezične kosti, hrustancev grla in zgornjega dela sapnika. Po urgentni traheo-

tomiji in dodatni diagnostiki s CT smo isti dan operativno v splošni anesteziji oskrbeli zlome obraznih kosti z odprto repozicijo in notranjo fiksacijo (zlom zgornje čeljusti tipa Le Fort II, večkratni zlom spodnje čeljusti parasimfizealno in zlom nosnih kosti) (slika 2, slika 3).

Zaradi kardiocirkulatorne nestabilnosti smo bolniku intraoperativno z UZ pregledali trebuh. Preiskava ni pokazala znakov poškodb parenhimskih organov. Po oskrbi obraznih poškodb smo bolnika sprejeli v Center za intenzivno terapijo (CIT). Tam so z računalniško-tomografsko angiografijo prsnega koša izključili poškodbo prsne aorte, odkrili pa sprednji in zadnji PM zgoraj in obojestransko pasivno atelektazo pljuč spodaj (slika 4, slika 5).

Kontrolni CT glave in grla ni odkril poškodb, zato je natančno mesto nastanka emfizema vratu in PM ostalo nerazjasnjeno. Tudi traheobronhoskopija in ezofagoskopija nista dali odgovora (vidne so bile le sufuzije grla, žrela in prehoda v požiralnik). Stanje bolnika je bilo v CIT stabilno, zato so ga začeli zbu-  
jati in so ga prevedli na spontano dihanje preko kanile. Zbujenega, traheotomiranega in antibiotično zaščitene bolnika smo sedmi dan premestili iz CIT na Klinični oddelek za maksilofacialno in oralno kirurgijo.

Ob prihodu je imel obilno izločanje iz kanile in nasičenost krvi brez dodatnega kisika je bila 85 %, pljuča so bila predihana, ote-



Slika 7. Intermaksilarna fiksacija s kambami in elastičnimi tegi za ureditev okluzijskih odnosov.



klina vratu se je zmanjšala. Bolniku je prvi dan na oddelku zelo padla nasičenost krvi s kisikom, zato ga je fizioterapevtka dvakrat predihavala, nato smo ga prevedli na čisti kisik (8 litrov) in vlaženje. Aspiracija iz kanile je bila obilna, penasta in občasno krvava. Naslednje dneve se je začelo bolnikovo stanje izboljševati, drugi dan smo odstranili kanilo in urinski kateter (slika 6). Vzrok za emfizem smo iskali naprej, zato smo bolnika poslali še na rentgensko preiskavo požiralnika s kontrastnim sredstvom, ki je pokazala minimalno zatekanje kontrasta v grlo, oslABLJENO peristaltiko požiralnika ter odsotnost znakov za predrtje požiralnika. Deveti dan po operaciji smo odstranili šive in elastične tege, dvanajsti dan še kambe (slika 7), nato pa bolnika v antibiotični zaščiti odpustili domov do kontrole.

## DISKUSIJA

PM lahko nastane po štirih mehanizmih:

- neposreden vdor zraka v medpljučje skozi raztrganino sapnika, sapnice ali požiralnika;
- raztrganine pljučnega parenhima povzročijo vdor zraka v pljučni intersticij, od tam pa ob adventiciji krvnih žil in sapnic v medpljučje;
- predrtje votlih trebušnih organov z vdorom zraka v medpljučje skozi *hiatus* trebušne prepone;
- vdor zraka v medpljučje preko fascialnih prostorov vratu.

Pri zadnjem mehanizmu je več možnosti. Zlom ščitastega ali prstanastega hrustanca odpre neposredno pot zraku v fascialne prostore vratu. Endotrahealna intubacija z zatrganjem piriformnega sinusa ali valesule povzroči iatrogeni PM. Zlom obraznih kosti omogoči povezavo med z zrakom napolnjenimi prostori glave (npr. obnosne votline) in fascialnimi prostori vratu (2).

PM, ki sledi izolirani obrazni poškodbi v odsotnosti poškodbe vratu, prsnega koša ali trebuha, je zelo redek pojav. Prvič ga je opisal Stockdale leta 1958 (3). V literaturi so med tistimi zlomi obraznih kosti, ki so povezani s PM, opisani zigomatikomaksilarni, orbitalni, mandibularni zlomi in zlomi kosti obnosnih votlin (1). Obnosne votline so pogost

izvor zraka, ki ustvari sekundarni emfizem pri frontalnih, nazoetmoidalnih in maksilarnih obraznih poškodbah s poudarkom na etmoidalnem sinusu in najvišjo prevalenco za periorbitalno regijo. Sekundarni emfizem pri obraznih poškodbah lahko nastane kadar koli, ko je prekinjena integriteta ustne sluznice in povišan intraoralni pritisk (3). S širjenjem zraka iz vratu v medpljučje se razvije PM. Širjenje je mogoče zaradi povezav med fascialnimi prostori vratu in medpljučja. Zlasti je pomembna medsebojna povezava parafaringealnega, retrofaringealnega, prevertebralnega, pretrahealnega, submandibularnega in sublingualnega prostora. Parafaringealni prostor je pot širitve zraka iz submandibularnega v retrofaringealni prostor, ki privede zrak v zgornje medpljučje, torej je retrofaringealni prostor glavna pot širitve zraka iz ust v medpljučje. Po tej poti potuje zrak pri zlomih spodnje čeljusti iz sublingualnega prostora v zgornje medpljučje. Za retrofaringealnim prostorom se razteza prevertebralni prostor od baze lobanje do trebušne prepone, imenovan tudi »nevarni prostor«, saj lahko omogoči vdor zraka tudi v spodnje dele zadnjega medpljučja in retroperitonej (1, 2, 4).

V naši ustanovi je operativna oskrba zlomov kosti obraznega skeleta ena od temeljnih dejavnosti in se izvaja skoraj vsakodnevno. Razvoj podkožnega emfizema obraza po poškodbi pogosto opažamo pri zlomih orbito-maksilo-zigomatičnega kompleksa in zgornje čeljusti, kadar se bolnik usekuje. Usekovanje je najpogostejši dejavnik razvoja podkožnega emfizema pri zlomih obraznih kosti, saj porine zrak skozi mukoperiostealne raztrgane zlomljenih kosti obnosnih votlin v podkožje lica in periorbite (4). Običajno nastane kmalu po poškodbi. Zatem se vstopna mesta zraka zatesnijo s krvnimi strdki. Takšen emfizem običajno ni nevaren, ob antibiotični podpori se namreč zrak v 2–14 dneh resorbira. Pomembno je, da bolnika opozorimo, naj se v obdobju po poškodbi ne usekuje, naj ne kaha, kašlja in se napanja (3).

Pojav obsežnega podkožnega emfizema vratu, ki se širi navzdol v medpljučje in navzgor v glavo, pa je redek sekundarni zaplet zloma obraznega skeleta, ki se lahko zelo hitro razvije v življenje ogrožajočo dihalno stisko ter zahteva takojšnjo prepoznavo in ukrepa-

nje, umetno dihalno pot – v skrajnem primeru urgentno traheotomijo (3). Bolnika s podkožnim emfizemom vratu, pri katerem se nismo odločili za traheotomijo, je treba skrbno opazovati, redno meriti nasičenost krvi s kisikom in opazovati dihanje, da ne bi spregledali razvijajoče se dihalne stiske ali obtočnih zapletov.

Za preprečitev resnih posledic je najpomembnejša prepoznavna tega redkega stanja, povezanega z zlomom obraznih kosti. Podkožni vratni in obrazni emfizem zlahka diagnosticiramo kot oteklino obraza in vratu z značilnimi krepitacijami vratu in nadključnične regije. PM se lahko kaže z resnimi dihalnimi ali obtočnimi simptomi, kot so:

- prsna bolečina zaradi raztezanja in disekcije medpljučničnega tkiva (lahko se širi v hrbet, vrat, roko ali ramo, lahko se poveča med požiranjem – zlahka jo zamenjamo za perikarditis, disekantno anevrizmo aorte ali miokardni infarkt),
- oteženo dihanje,
- požiranje,
- hripavost in
- cianoza.

Pri 50 % bolnikov s PM s stetoskopom ugotovimo Hammanov znak (glasen praskajoč šum) pri avskultaciji levega prednjega hemitoraksa med srčnim iztisom in med izdihom (izgine pa med vdihom in v sedečem položaju), katerega mehanizem je pritisnjenje srca ob prosti zrak znotraj medpljučja. Radiološko PM dokažemo s prikazom prostega zraka v medpljučju, nujno je narediti posteroanteriorni in stranski rentgenogram prsnega koša (1, 2, 4, 5). V literaturi so opisane možne nenormalnosti v elektrokardiogramu bolnikov s PM, ki je sicer običajno normalen, v 25 % se lahko pojavijo nespecifični segmenti S-T, inverzije vala T, premik električnih srčnih osi in tahikardija (1, 4).

Ko z ustreznimi ukrepi stabiliziramo bolnika, poskušamo z različnimi preiskovalnimi metodami najti mesto nastanka emfizema (CT glave, CT vratu in prsnega koša, rentgenska preiskava požiralnika s kontrastnim sredstvom, neposredna laringoskopija in bronhoskopija) (5). Izključiti moramo poškodbe grla, sapnika in požiralnika, pa tudi pnevmoperi-

karda, možnega zapleta PM (4). Negativen izvid otorinolaringologa in izvid CT ne izključujeta poškodb v predelu spodnjega dela žrela in grla. Emfizem vedno pomeni, da nekje pušča zrak, in je posredni znak, ki kaže na poškodbo zgornjega dihalno-prebavnega trakta ter opozarja na previdnost, tudi če ne dokažemo poškodb (mesta puščanja zraka). Pri našem bolniku je natančno mesto nastanka emfizema vratu in PM ostalo nerazjasnjeno. Čeprav smo sumili, da gre za zlom grla, tega nismo uspeli dokazati. Bolnike z zlomi obraznih kosti in pridruženim podkožnim emfizemom vratu ter PM je treba skrbno opazovati, priključiti na monitor in 100 % kisik, kar pospeši resorpcijo PM, zniža parcialni tlak dušika in posledično zviša gradient resorpcije dušika iz tkiv ter prepreči nadaljnje večanje PM. Anesteziista je treba opozoriti na prisotnost PM, saj predstavlja relativno kontraindikacijo za uporabo dušikovega oksida, ki lahko z difuzijo v telesne votline poveča PM. Za zmanjšanje tveganja razvoja mediastinitisa je treba bolnika antibiotično zaščititi. Zaželeno je čimprejšnja dokončna oskrba ran in zlomov kosti obraznega skeleta, kar prepreči večanje PM (1, 2, 4, 6). Našega bolnika nismo intubirali, temveč traheotomirali takoj po prepoznavi resnosti stanja. S kirurškim zdravljenjem (traheotomijo) smo preprečili slabšanje stanja, napredovanje PM in smo bolnika tako stabilizirali.

S tem prispevkom bi radi opozorili na dejstvo, da je pri zlomih kosti obraznega skeleta mogoč zaplet razvoj podkožnega emfizema vratu s tendenco širjenja in da je vsak takšen bolnik potencialno ogrožen, ker mu grozi dihalna stiska in obtočni zapleti (tenzijski PM, tenzijski pnevmotoraks, pnevmoperikard s srčno tamponado ali brez nje, obstrukcija velikih žil, smrt) (2, 3). Takšnega bolnika moramo sprejeti v bolnišnico in skrbno opazovati. V literaturi so opisani tudi izguba vida in oslabelost spodnjih štirih možganskih živcev zaradi pritiska nabranega zraka (oteženo požiranje, hripavost, omejena abdukcija roke, deviacija jezika pri izplazenju) ter resne okužbe zaradi vdora okuženega zraka v globoke tkivne prostore (3).

## ZAKLJUČEK

PM se v povezavi z izolirano poškodbo obraznega skeleta razvije zelo redko. Simptomi so lahko samoomejujoči in preidejo brez kirurškega zdravljenja s spontano resorpcijo zraka

iz medpljučja v nekaj dneh. Zdravljenje PM tedaj obsega le počitek, analgezijo in opazovanje. Možen razvoj ogrožajočih dihalnih in obtočnih zapletov zahteva sprejem bolnika v bolnišnico in izjemno skrbno opazovanje ter največkrat kirurško zdravljenje (traheotomijo).

## LITERATURA

1. Minton G, Tu HK. Pneumomediastinum, pneumothorax, and cervical emphysema following mandibular fractures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984; 57 (5): 490–3.
2. Abrahamian FM, Pollack CV. Traumatic pneumomediastinum caused by isolated blunt facial trauma: a case report. *J Emerg Med.* 2000; 19 (1): 43–6.
3. Brasileiro BF, Cortez AL, Asprino L, et al. Traumatic subcutaneous emphysema of the face associated with paranasal sinus fractures: a prospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 63 (8): 1080–7.
4. Ashley M, Jones C. Pneumomediastinum: an unusual radiographic finding following mid-facial trauma injury. *Injury.* 1997; 28 (3): 229–30.
5. Kumar D, Finlayson BJ. Pneumomediastinum: a rare presentation in emergency department following blunt trauma to neck during a football match. *Injury Extra.* 2007; 38 (3): 67–9.
6. Caraballo V, Barish RA, Floccare DJ. Pneumomediastinum presenting as acute airway obstruction. *J Emerg Med.* 1996; 14 (2): 159–63.

Prispelo 23. 8. 2009

Maja Pavčnik - Arnol<sup>1</sup>, Rina Rus<sup>2</sup>

# Nefrotski sindrom v otroštvu – prikaz primera

## *Childhood Nephrotic Syndrome – Case Report*

---

### IZVLEČEK

**KLJUČNE BESEDE:** nefrotski sindrom, proteinurija, otroci

Nefrotski sindrom je ena pogostejših ledvičnih bolezní otrok in je posledica poškodbe glomerulne filtracijske pregrade. Za bolezen so značilni edemi, nefrotska proteinurija, hipoalbuminemija in hiperlipidemija. Najpogostejša oblika nefrotskega sindroma pri otrocih je idiopatski nefrotski sindrom. Večina otrok na zdravljenje z glukokortikoidi dobro odgovori in ima kljub pogostim relapsom dober dolgoročen izid bolezni. Deset odstotkov otrok je na zdravljenje z glukokortikoidi neodzivnih. Pri teh otrocih je verjetnost razvoja kronične ledvične bolezni večja. Prispevek prikazuje primer deklice, ki je bila v starosti treh let prvič obravnavana v bolnišnici zaradi otekanja okoli oči in spodnjih okončin. S preiskavami smo potrdili diagnozo idiopatskega nefrotskega sindroma. Na osnovi primera je prikazan stopenjski pristop k zdravljenju idiopatskega nefrotskega sindroma pri otroku.

---

### ABSTRACT

**KEY WORDS:** nephrotic syndrome, proteinuria, children

Nephrotic syndrome is among the most common kidney diseases in children and it occurs as a result of damage to the glomerular filtration barrier. It is characterized by edema, nephrotic range proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia. The most common form of childhood nephrotic syndrome is idiopathic nephrotic syndrome. Most children respond to steroid therapy and although they have repeated relapses, they are unlikely to develop chronic kidney disease. However, ten percent of children fail to respond to steroid therapy and are at an increased risk of developing end-stage renal disease. The paper describes the case of a 3-year old girl who presented to hospital with periorbital and lower limb edema and the diagnosis of idiopathic nephrotic syndrome was confirmed. The stepwise approach to the treatment of childhood nephrotic syndrome is also described.

---

<sup>1</sup> Asist. dr. Maja Pavčnik - Arnol, dr. med., Klinični oddelek za otroško kirurgijo in intenzivno terapijo, Kirurška klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva 20, 1525 Ljubljana; maja.pavcnik@kclj.si

<sup>2</sup> Asist. dr. Rina Rus, dr. med., Klinični oddelek za nefrologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Bohoričeva 20, 1525 Ljubljana

## UVOD

Nefrotski sindrom (NS) je ena pogostejših ledvičnih boleznih pri otrocih. Zanj so značilni edemi, nefrotska proteinurija, hipoalbuminemija in hiperlipidemija (1, 2). O nefrotski proteinuriji govorimo, kadar je v urinu  $\geq 40$  mg/m<sup>2</sup>/h beljakovin (24-urni urin) oziroma pri razmerju beljakovine/kreatinin v enkratnem vzorcu urina  $>0,26$  (koncentracija beljakovin v urinu izražena v g/L, koncentracija kreatinina v urinu izražena v  $\mu$ mol/L) (3, 4). Hipoalbuminemija je opredeljena kot serumska koncentracija albuminov  $<30$  g/L (3).

Najpogostejša oblika NS v otroštvu je idiopatski NS (5). 85–90% otrok z idiopatskim NS ima histološko sliko glomerulopatije z minimalnimi spremembami, dober odgovor na zdravljenje z glukokortikoidi ter dober dolgoročni izid brez razvoja kronične ledvične bolezni (1, 5).

Prispevek prikazuje primer deklice, ki je bila v starosti treh let prvič obravnavana v bolnišnici zaradi otekanja okoli oči in spodnjih okončin. S preiskavami smo potrdili diagnozo idiopatskega NS. Na osnovi primera je prikazana obravnava otroka z NS in stopenjski pristop k zdravljenju.

## PRIKAZ PRIMERA

Triletna deklica je bila sprejeta na Klinični oddelek za nefrologijo Pediatrične klinike v Ljubljani zaradi otekanja okoli oči in gležnjev. V družinski in obporodni anamnezi ni bilo posebnosti. Kasneje je bila enkrat zdravljena zaradi bronhitisa, prebolela je tudi norice. Opravila je redna cepljenja in ni imela alergij. Tri dni pred sprejemom v bolnišnico so starši opazili, da oteka okoli oči in gležnjev. Oteklina okoli oči je bila najizrazitejša zjutraj, oteklina stopal in gležnjev pa je naraščala preko dneva. Pred pojavom oteklin je bila nekaj dni nahodna, zvišane telesne temperature ni imela. Ob sprejemu je bila telesna teža 16 kg, telesna višina 97 cm. Krvni tlak je bil normalen (90/60 mmHg), pulz 100/min. Razen periorbitalnih in vtisljivih pretibialnih edemov je bil preostanek kliničnega pregleda normalen. S krvnimi preiskavami smo dokončno potrdili diagnozo nefrotskega sindroma (proteinurija: beljakovine 7,9 g v 24-urnem urinu,

kar je 500 mg/m<sup>2</sup>/h, hipoalbuminemija: albumini 18 g/L, hiperholesterolemija: celokupni serumski holesterol 14,3 mmol/L). Hemogram, C-reaktivni protein (CRP), ionogram in dušični retenti so bili normalni, vključno z vrednostmi komplementa. V urinu je bila prisotna mikrociturija (32 eritrocitov/mm<sup>3</sup>). V kasnejših urinskih izvidih hematurije nismo več zasledili. Bris žrela na patogene bakterije je bil negativen. UZ preiskava trebuha in sečil je bila normalna, prav tako RTG prsnih organov. Pričeli smo jo zdraviti z metilprednizolonom, ki ga je prejela enkrat dnevno (1 mg/kg). Večkrat je prejela tudi infuzijo humanih albuminov in furosemid. Proteinurija se je ob zdravljenju postopno normalizirala, remisija je nastopila 30. dan. Po petih tednih smo prešli na alternantno zdravljenje, kar pomeni, da je deklica prejela metilprednizolon v odmerku 1 mg/kg vsak drugi dan. Po 4 tednih alternantnega zdravljenja (skupno 9 tednih zdravljenja) smo odmere glukokortikoidov pričeli postopno zniževati.

V naslednjih 12 mesecih je deklica ob zniževanju metilprednizolona prebolela štiri ponovne zagone nefrotskega sindroma, ki so se vsakič pojavili ob prebolevanju akutne okužbe dihal. Remisija je ob vsakem ponovnem zagonu nastopila med 10. in 11. dnem zdravljenja z visokim odmerkom metilprednizolona. Ob 4. zagonu je bila deklica ob sprejemu v bolnišnico prizadeta, somnolentna, subfebrilna, kušingoidnega videza, otekla predvsem okoli oči, gležnjev in pretibialno. Prisotni so bili znaki hipovolemije s tahikardijo in slabo periferno perfuzijo. Žrelo je bilo pordelo, prisotne so bile povečane submandibularne bezgavke. V izvidih je bila povišana serumska koncentracija sečnine ob normalnem kreatininu, prisotni so bili znaki hemokontencije. Serumska koncentracija celokupnega holesterola je bila 7,2 mmol/L in albuminov 17 g/L. Zaradi znakov hipovolemije je 6 dni zapored prejela infuzijo 20% humanih albuminov (1,5 g/kg/dan). Po normalizaciji hipovolemije je redno dobivala tudi furosemid.

Zaradi pogostih ponovnih zagonov oziroma odvisnosti od steroidov smo dodatno uvedli citostatik ciklofosamid, ki ga je uživala v odmerku 1,5 mg/kg telesne teže na dan. Hkrati je bila zdravljena tudi z metilpredni-

zolonom v odmerku 0,5 mg/kg/dan. Po 6 mesecih zdravljenja s ciklofosfamidom in metilprednizolonom je bila še vedno v remisiji. Ciklofosfamid smo po 6 mesecih ukinili zaradi doseženega najvišjega skupnega odmerka. En mesec po ukinitvi ciklofosfamida je še prejemala metilprednizolon v nespremenjenem odmerku. Ker je bila ob tem še vedno v remisiji, smo pričeli odmerek metilprednizolona postopno nižati in z zdravljenjem zaključili po osmih mesecih. Dekle od zaključenega zdravljenja pri petih letih do sedaj, ko je stara 22 let, ni imela ponovnih zagonov nefrotskega sindroma.

## RAZPRAVLJANJE

NS je posledica različnih bolezenskih stanj, ki povečajo prepustnost glomerulne filtracijske pregrade za beljakovine plazme. Stena glomerulnih kapilar sestoji iz treh slojev (fenestrirane endotelijske celice, glomerulna bazalna membrana, epiteljski podociti), ki selektivno – na osnovi velikosti molekul (npr. imunoglobulini G) in njihovega električnega naboja (npr. albumin) – preprečujejo prestop beljakovin plazme v urin. Proteinurija je tako lahko posledica strukturnih sprememb ali pa izgube negativnega električnega naboja na glomerulni filtracijski pregradi (1). Pri glomerulopatiji z minimalnimi spremembami, ki je najpogostejša oblika NS v otroštvu, gre

za izgubo negativnega električnega naboja brez strukturnih sprememb, vidnih s svetlobnim mikroskopom, elektronsko mikroskopsko pa je vidno zlitje nožic podocitov (3).

## Klasifikacija nefrotskega sindroma

Večina klasifikacij NS združuje osnovni vzrok in histološko sliko sprememb, vidnih pri ledvični biopsiji (tabela 1). Primarni NS je opredeljen kot NS brez sistemske bolezni (1). Če se NS pojavi v sklopu sistemske bolezni ali je posledica znanega dejavnika (okužbe, zdravila), gre za sekundarni NS. Pri otroku, mlajšem od enega leta, govorimo o kongenitalnem in infantilnem NS, ki je najpogosteje posledica mutacije enega od genov (NPHS1, NPHS2, WT1, LAMB2) za različne beljakovine v steni glomerulnih kapilar (6).

Idiopatski NS je najpogostejša oblika NS v otroštvu. Predstavlja več kot 90 % primerov NS pred 10. letom starosti in 50 % primerov NS po 10. letu starosti (7). Razlikujemo tri histološke oblike idiopatskega NS: glomerulopatijo z minimalnimi spremembami, primarno fokalno segmentno glomerulosklerozo in mezangijski proliferativni glomerulonefritis (tabela 1) (1, 2). Ni povsem jasno, ali te tri histološke oblike predstavljajo različne bolezni ali gre morda za spekter istega bolezenskega procesa (2). 85–90 % otrok z idio-

Tabela 1. Primarni in sekundarni vzroki nefrotskega sindroma v otroštvu (prirejeno po Eddy AA, et al.) (1). GN – glomerulonefritis, NS – nefrotski sindrom.

Primarni nefrotski sindrom	
<b>Glomerulopatija z minimalnimi spremembami</b>	
Fokalna segmentna glomerulosklerozo	IDIOPATSKI NS
Mezangijski proliferativni GN	
Membranoproliferativni GN/mezangiokapilarni GN	
Membranska nefropatija	
Sekundarni nefrotski sindrom	
Sistemske bolezni	Sistemiški eritematozni lupus, purpura Henoch-Schönlein, sladkorna bolezen, sarkoidoza
Okužbe	Hepatitis B in C, HIV, postreptokokni GN, infekcijski endokarditis
Hematološko-onkološke bolezni	Anemija srpastih eritrocitov, Hodgkinov limfom, levkemije
Zdravila	Nesteroidni antirevmatiki, penicilamin, kaptopril
Drugo	Debelost, nosečnost, Eisenmengerjev sindrom, čebelji pik, prehranske alergije

patiskim NS, mlajših od 6 let, ima histološko sliko glomerulopatije z minimalnimi spremembami. V obdobju adolescence je delež glomerulopatije z minimalnimi spremembami le še 20–30%. Pri starejših otrocih je pogostejša fokalna segmentna glomeruloskleroza (1).

S stališča obravnave otroka z NS je ključno razlikovati idiopatski NS od drugih oblik NS. V prid idiopatskega NS govorijo starost nad 1 leto in pod 6 let, odsotnost hipertenzije, odsotnost hematurije, normalne vrednosti komplekta v serumu in normalno delovanje ledvic (7).

### Anamneza

V družinski anamnezi nas zanimajo podatki o ledvičnih in sistemskih boleznih, ki lahko povzročajo NS. V osebni anamnezi je pomemben podatek o prejšnjih ali sočasnih boleznih ter zdravljenih, zunajledvičnih simptomih in znakih (sklepi, izpuščaji), prebolevanju akutnega tonzilofaringitisa ali impetiga, izpostavljenosti okužbi s hepatitisom B, C, HIV (8).

Prva epizoda in kasnejši ponovni zagoni pogosto sledijo okužbam zgornjih dihal (3). To je nazorno prikazano tudi v našem primeru, saj so pri deklici prva manifestacija bolezni in vsi relapsi sledili akutni okužbi dihal.

### Klinična slika

Idiopatski NS je pogostejši pri dečkih (2 : 1). Najpogosteje se razvije v starosti 2–6 let. Za bolezen so značilni edemi, ki so sprva blagi in se najprej pojavijo okoli oči. Periorbitalni edemi so prisotni zjutraj, preko dneva splahnijo, čez dan se pojavijo edemi spodnjih okončin. Pojav značilnih edemov smo opazili tudi pri deklici, ki je predstavljena v našem primeru in pripada značilni starostni skupini. Postopno se edemi lahko generalizirajo, lahko nastaneta ascites in plevralni izliv. Zaradi ascitesa se lahko pojavita dimeljska in popkova kila, otroci so neješčji, razdražljivi, tožijo za bolečinami v trebuhu, lahko imajo drisko. Večji plevralni izliv je lahko vzrok dihalne stiske. Otroci z NS imajo pogosto znižan znotrajžilni volumen, zato lahko ob pregledu najdemo znake hipovolemije (tahikardijo, slabo poljne pulze, podaljšan kapilarni povratek, hladne okončine, oligurijo) (3, 9). Hipovolemija

otroka življenjsko ogroža, zato moramo te znake aktivno iskati in nadzorovati. Hipotenzija je pri otrocih znak že napredovalega šoka (9). V prikazanem primeru je deklica kazala znake hipovolemije ob 4. relapsu. Imela je anamnestične (oligurija), klinične (somniačenca, tahikardija, slabše polnjeni pulzi, podaljšan kapilarni povratek) ter laboratorijske znake hipovolemije (zvišana serumska koncentracija sečnine ob normalnem kreatininu, zvišan hematokrit).

### Laboratorijske in slikovne preiskave

Na osnovi anamneze in klinične slike postavljen sum na NS potrdimo ali ovzremo s pomočjo laboratorijskih preiskav. Pri začetni laboratorijski diagnostiki določimo izločanje beljakovin v urinu (enkratni vzorec urina, 24-urni urin), v serumu določimo elektrolite, kreatinin, sečnino, celokupne beljakovine, albumine, holesterol, komponenti komplekta C3 in C4, protitelesa ANA, titer anti-streptolizinskih O protiteles, protitelesa na hepatitis B, C in HIV. Pri vsakem otroku opravimo tudi UZ trebuha in sečil. Ti testi potrdijo diagnozo, ugotovijo prisotnost morebitnega zmanjšane delovanja ledvic in dajo pomembne podatke o etiologiji nefrotskega sindroma.

**Preiskave urina.** Določimo izločanje beljakovin – nefrotska proteinurija je pomemben kriterij NS. Pregledamo tudi sediment urina. Hematurija ni značilna za idiopatski NS, pojavlja pa se lahko pri drugih glomerulopatijah, ki povzročajo NS. Prav tako pri idiopatskem NS v urinu ne najdemo eritrocitnih cilindrov (8).

**Preiskave krvi.** Hipoalbuminemija je eden od potrebnih kriterijev za diagnozo NS in je opredeljena kot serumska koncentracija albumina < 30 g/L (3). Najdemo tudi hiperholesterolemijo. Ledvično delovanje je pri idiopatskem NS normalno, pogosto pa imajo bolniki zaradi hipovolemije zvišano koncentracijo sečnine ob normalni koncentraciji kreatinina (9). Na račun hipovolemije sta pogosto zvišana tudi serumska koncentracija hemoglobina in hematokrit. Anemija ni značilnost idiopatskega NS, pogosta pa je trombocitoza s številom trombocitov  $500\text{--}1000 \times 10^9/L$ .

Hemokoncentracija in trombocitoza sta dejavnika tveganja za trombotične zaplete NS (10).

Določanje komponent komplemента je v pomoč pri razlikovanju primarnega in sekundarnega NS. Za poinfekcijski glomerulonefritis je značilna nizka koncentracija komponente komplemента C3, pri lupusnem nefritisu sta znižani komponenti komplemента C3 in C4, pri idiopatskem NS je vrednost komplemента v serumu normalna. Za izključitev ali potrditev sekundarnega nefrotskega sindroma določimo tudi protitelesa ANA, titer antistreptolizinskih O protiteles, protitelesa na hepatitis B in C ter HIV.

**Bris žrela ali impetiginoznih kožnih sprememb na patogene bakterije.** Za diagnosticiranje postreptokoknega glomerulonefritisa.

**UZ trebuha, sečil, pleuralnega prostora.** UZ preiskava nam poleg ocene ledvic omogoča oceno volumskega stanja bolnika, oceno prisotnosti ascitesa, pleuralnega ali perikardialnega izliva. Z njo lahko potrdimo ali izključimo trombotične zaplete NS (3).

**Ledvična biopsija.** Domnevno diagnozo glomerulopatije z minimalnimi spremembami lahko postavimo glede na anamnestične, klinične in laboratorijske podatke. Več kot 90% bolnikov z glomerulopatijo z minimalnimi spremembami dobro odgovori na zdravljenje z glukokortikoidi. Zaradi teh dveh razlogov pri bolnikih, ki imajo najverjetneje glomerulopatijo z minimalnimi spremembami, pričnemo z zdravljenjem brez predhodne ledvične biopsije. Na ta način se lahko pri 80% otrok z NS, ki so stari od 1 do 10 let, ledvični biopsiji izognemo (8).

## Diferencialna diagnoza

Diferencialno diagnostično moramo pomisliti na druge vzroke edemov pri otroku: alergij-

ska reakcija, enteropatija z izgubo beljakovin, okvara jeter, srčno popuščanje, beljakovinska nedohranjenost (3).

Na drugo glomerulno patologijo (in ne glomerulopatijo z minimalnimi spremembami) moramo pomisliti v naslednjih primerih (1, 3):

- starost < 1 leto ali > 10 let,
- pozitivna družinska anamneza,
- znaki zunajledvične prizadetosti (arthritis, izpuščaji, anemija),
- arterijska hipertenzija,
- makroskopska hematurija,
- zmanjšano ledvično delovanje,
- aktiven sediment seča (eritrociturija, eritrocitni cilindri),
- znižana koncentracija komponent komplemента.

V našem primeru je imela deklica vse anamnestične, klinične in laboratorijske značilnosti idiopatskega NS. Ob prvem pregledu urina je bila prisotna eritrociturija, kar ni značilnost idiopatskega NS, vendar je le-ta kasneje izzvenela. V literaturi je opisano, da je mikrohematurija prisotna pri 15–20% bolnikov z glomerulopatijo z minimalnimi spremembami, vendar običajno ni perzistentna (8).

## Zdravljenje

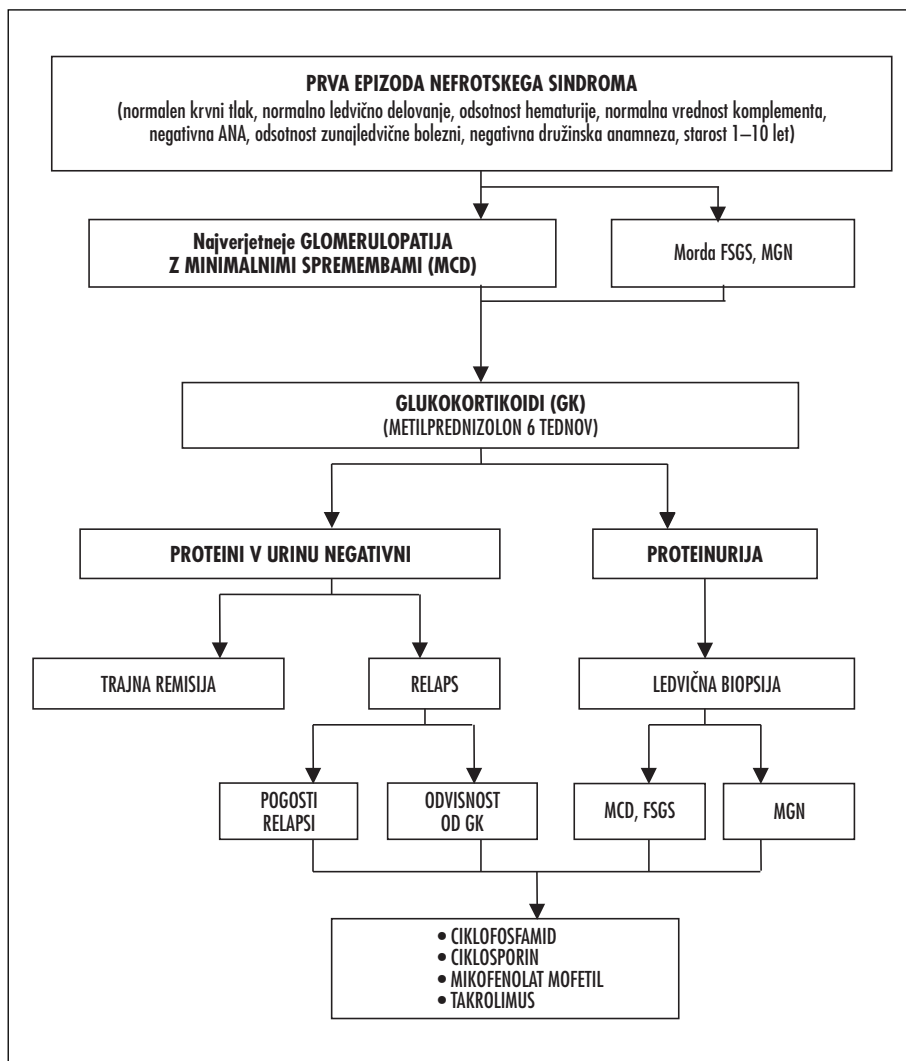
**1. Zdravljenje z glukokortikoidi.** Pogosti izrazi, s katerimi se srečujemo pri zdravljenju NS, so opredeljeni v tabeli 2. Shema zdravljenja idiopatskega NS pri otroku je prikazana na sliki 1.

Otroke s prvo epizodo NS, stare med 1 in 10 let, pričnemo zdraviti z glukokortikoidi brez predhodne ledvične biopsije, ker je najverjetneje, da imajo glomerulopatijo z minimalnimi spremembami. Metilprednizolon

Tabela 2. Pogosti izrazi, s katerimi se srečujemo pri zdravljenju nefrotskega sindroma (8).

Nefrotski sindrom	Edemi, nefrotska proteinurija, hipalbuminemija, hiperlipidemija.
Ponovni zagon	Nefrotska proteinurija, ki traja tri zaporedne dni.
Remisija	Izločanje beljakovin z urinom < 4 mg/m <sup>2</sup> /h (24-urni urin) ali beljakovine, negativne/v sledovih pri testiranju s testnimi lističi 3 dni zapored.
Pogosti ponovni zagoni	≥ 2 ponovna zagona v 6 mesecih po prvi remisiji; ≥ 4 ponovni zagoni v 12 mesecih po prvi remisiji.
Odvsnost od glukokortikoidov	Pojav 2 zaporednih zagonov med zdravljenjem z glukokortikoidi ali v 2 tednih po ukinitvi glukokortikoidov.
Neodzivnost na glukokortikoido	Ni remisije po 4–6 tednih rednega dnevnega zdravljenja z metilprednizolonom.





Slika 1. Shema zdravljenja idiopatskega nefrotskega sindroma pri otroku (8). MCD – glomerulopatija z minimalnimi spremembami (angl. minimal change disease), FSGS – fokalna segmentna glomeruloskleroza, MGN – mezangijski proliferativni glomerulonefritis, GK – glukokortikoidi.

dajemo v odmerku  $60 \text{ mg/m}^2/\text{dan}$  (največji odmerek  $60 \text{ mg/dan}$ ) 4–6 tednov (11, 12). Redno spremljamo proteinurijo. Ko je urin 3 dni zapored negativen na beljakovine oz. so le-te prisotne le v sledovih, govorimo o remisiji (tabela 2). Pri veliki večini otrok, ki odgovorijo na zdravljenje z glukokortikoidi, remisija nastopi znotraj 4 tednov od začetka zdravljenja (3). Ob doseženi remisiji preidemo po 4–6 tednih od pričetka zdravljenja na alter-

nantno odmerjanje glukokortikoidov vsak drugi dan, po 4–6 tednih alternantnega zdravljenja glukokortikoide postopno ukinemo. Zdravljenje prve epizode NS naj bi tako skupaj trajalo 4 do 5 mesecev (8, 13). Le približno 15–30% bolnikov, ki odgovorijo na glukokortikoide, doseže trajno remisijo, pri preostalih se bolezen ponavlja (tabela 2). 10–20% bolnikov ima redke ponovne zagone, 30–40% bolnikov, ki so odgovorili na glukokortikoide,

pa ima pogoste ponovne zagone ali pa so od glukokortikoidov odvisni (tabela 2). Ponovne zagone prav tako kot prvo epizodo zdravimo z glukokortikoidi, vendar v tem primeru takoj po doseženi remisiji preidemo na odmerjanje vsak drugi dan za 1–2 meseca, nato pa odmerek postopno zmanjšujemo v naslednjih 1–2 mesecih. Pri nekaterih bolnikih pride do ponovnega zagona ob zniževanju odmerka ali znotraj 14 dni od ukinitve glukokortikoidov. Ti bolniki za vzdrževanje remisije potrebujejo trajno zdravljenje z glukokortikoidi – govorimo o od glukokortikoidov odvisnem NS (tabela 2). Če po 4–6 tednih rednega zdravljenja z glukokortikoidi proteinurija v nefrotskem območju še vedno vztraja, govorimo o NS, ki je neodziven na glukokortikoide (tabela 2). Pri teh bolnikih je indicirana ledvična biopsija (8). Glede na njen izvid se lahko odločamo za različne sheme zdravljenja z drugimi zdravili (ciklofosfamid, ciklosporin, takrolimus, mikofenolat mofetil) (3, 8). Pri bolnikih s pogostimi ponovnimi zagoni in bolnikih, ki so odvisni od glukokortikoidov, lahko nekatera zdravila (npr. ciklofosfamid) uvedemo brez ledvične biopsije. Vedno pa moramo ledvično biopsijo opraviti pred uvedbo ciklosporina ali takrolimusa. Indikacija za zmanjšanje odmerka glukokortikoidov in dodatek drugih zdravil je tudi pojav stranskih učinkov glukokortikoidov (3).

Če pogledamo primer naše bolnice, vidimo, da je imela pogoste ponovne zagone (4 zagoni v 12 mesecih). Istočasno je bila od glukokortikoidov odvisna, saj je do vseh ponovitev prišlo ob zniževanju glukokortikoidov. Ponovni zagoni so sledili akutni okužbi dihal, kar je značilnost idiopatskega NS (3). Remisija je ob prvi epizodi NS nastopila pozno (30. dan zdravljenja), ponovitev pa je bila zgodnja (znotraj 6 mesecev od pričetka zdravljenja). Po pregledu literature lahko ugotovimo, da sta pojav remisije kasneje kot v 7–9 dneh in pojav zgodnjega ponovnega zagona napovedna dejavnika za pogoste ponovitve boleznih (14, 15). Ker bi za vzdrževanje remisije potrebovala visok odmerek glukokortikoida (>0,5 mg/kg vsak drugi dan), smo se odločili za zdravljenje s ciklofosfamidom, na katerega je odlično odgovorila. Bolniki, ki vsaj delno odgovorijo na začetno zdravljenje z glukokortikoidi, bolj verjetno odgovorijo na zdravljenje z drugimi

zdravili v primerjavi z bolniki brez kakršnega koli odziva na glukokortikoide (8). S stopenjskim pristopom k zdravljenju, ki je prikazan na sliki 1, smo tako pri naši bolnici dosegli dober izid brez ledvične biopsije, ki je invazivna preiskava. Morda bi lahko dosegli nižje število ponovnih zagonov z daljšim zdravljenjem prve epizode in uporabo višjih odmerkov glukokortikoidov. Nekateri študije namreč kažejo, da daljše začetno zdravljenje prve epizode NS zmanjša verjetnost ponovnega zagona bolezni (16, 17). Prav tako naj bi bili relapsi redkejši ob višjih odmerkih glukokortikoidov ob alternantnem zdravljenju (13).

**2. Simptomatsko zdravljenje edemov in hipovolemije.** Vsem bolnikom z nefrotskim sindromom predpišemo uživanje manj slane hrane in ob normovolemiji zmerno omejimo uživanje tekočin.

Za simptomatsko zdravljenje je ključnega pomena razlikovanje otrok z edemi in normovolemijo ter otrok z edemi in hipovolemijo. Cilj zdravljenja z 20 % humanimi albumini je v teh dveh primerih različen. Pri hipovolemiji infuzija 20 % humanih albuminov poveča cirkulirajoči volumen krvi in izboljša sistemsko perfuzijo. Pri normovolemičnem otroku s hudimi edemi pa infuzija albuminov spodbudi premik tekočine iz intersticijskega v znotrajžilni prostor, s kasnejšim dodatkom furosemida pa tudi diurezo. Pri hipovolemičnem otroku neustrezna uporaba furosemida hipovolemijo poslabša in lahko sproži razvoj šokovnega stanja. Zato je ključna klinična in laboratorijska ocena znotrajžilnega volumna. V primeru hipovolemije svetujemo infuzijo 20 % humanih albuminov v odmerku 1 g/kg telesne teže v 4 urah. Prehitra infuzija poveča verjetnost preobremenitve s tekočino, ki se kaže s hipertenzijo, znaki srčnega popuščanja (polne vratne vene, galopni ritem, povečana jetra) in pljučnim edemom. Ob znakih hipovolemije furosemida ne damo. Če je otrok normovolemičen in ima hude edeme, svetujemo 20 % humane albumine v odmerku 1 g/kg telesne teže v 4-urni infuziji in furosemid intravenozno v odmerku 1 mg/kg po 2 urah infuzije humanih albuminov (9). Blagi edemi so le kozmetično moteči, zato se pri bolnikih z blagimi edemi in normovolemijo ne odločamo za simptomatsko zdravljenje. Zlasti

se izogibamo diuretikom, ki lahko povečajo verjetnost trombemboličnih zapletov.

**3. Zdravljenje hiperlipidemije.** Svetujemo uživanje manj mastne hrane. Pri otrocih s kroničnim potekom lahko uvedemo zdravljenje s statini (18).

**4. Inhibitorji angiotenzinske konvertaze/antagonisti angiotenzinskih receptorjev.** Zlasti pri bolnikih, ki so odporni na zdravljenje z glukokortikoidi, lahko proteinurijo zmanjšamo z uporabo ACE inhibitorjev in/ali antagonistov angiotenzinskih receptorjev. Nespecifično zmanjšanje proteinurije zmanjšuje sekundarno poškodbo glomerulov in upočasni napredovanje bolezni (19).

## Zapleti

Glavni dve skupini zapletov pri NS v otroštvu so okužbe in trombotični zapleti.

**Okužbe.** Zaradi izgubljanja imunoglobulinov in properdin faktorja B z urinom, motene celične imunosti, imunosupresivnega zdravljenja ter edemov/ascitesa, ki predstavljajo dobro gojišče za bakterije, so otroci z NS bolj podvrženi okužbam. Najpogostejša okužba je spontani bakterijski peritonitis, lahko pa se pojavijo tudi sepsa, pljučnica, celulitis in okužbe sečil. Ker so zvišana telesna temperatura in klinični znaki okužbe ob zdravljenju z glukokortikoidi lahko minimalni, je potrebna posebna pozornost in zgodnja uvedba antibiotičnega zdravljenja. Za otroke z NS se priporoča dodatno cepljenje proti pnevmokoku, noricam in gripi. Cepljenja naj se opravijo, ko je bolezen v remisiji. Če pride pri otroku z NS, ki še ni prebolel noric, do stika z noricami, svetujejo zaščito z varičela-zoster imunoglobulini znotraj 72 ur od stika.

**Trombotični zapleti.** Ti zapleti se pojavijo pri 2–5 % otrok z NS (tromboza ledvične vene, pljučna embolija, tromboza sagitalnega sinusa, tromboza ob žilnih katetrih). Hiperkoagulabilnost je posledica zvišanih protrombotičnih dejavnikov (fibrinogen, trombocitov, hemokonzracija, imobilizacija) in znižanih fibrinolitičnih dejavnikov (izguba antitrombina III, proteinov S in C z urinom). Antikoagulantna zaščita se priporoča le ob podatku o predhodnem trombotičnem dogodku.

## Napoved izida

Najpomembnejši prognostični dejavnik pri otrocih z idiopatskim NS je odziv na glukokortikoide.

Večina otrok z idiopatskim NS odgovori na zdravljenje z glukokortikoidi. Večina teh otrok ima sicer ponovitve, ki pa so sčasoma vse redkejše, in ti otroci običajno ne razvijejo kronične ledvične bolezni (1, 3).

Otroci, ki ne odgovorijo na zdravljenje z glukokortikoidi, imajo v večini primerov histološko sliko fokalne segmentne glomeruloskleroze. Ti otroci pogosto razvijejo napredujočo kronično ledvično bolezen, ki zahteva nadomestno zdravljenje z dializo ali presaditvijo ledvic. Pri bolnikih s fokalno segmentno glomerulosklerozo se v 30–50 % bolezni ponovi na presajeni ledvici (1, 3, 20).

## ZAKLJUČEK – KLJUČNO SPOROČILO

- Diagnozo NS postavimo, kadar so prisotni edemi, nefrotska proteinurija, hipoalbuminemija in hiperlipidemija.
- NS je posledica poškodbe glomerulne filtracijske pregrade, ki postane bolj prepustna za beljakovine plazme.
- Najpogostejša oblika NS v otroštvu je idiopatski NS s tremi različnimi histološkimi slikami, med katerimi je zlasti pri otrocih, mlajših od 6 let, najpogostejša glomerulopatija z minimalnimi spremembami.
- Pri obravnavi otroka z NS ne smemo pozabiti, da je znotrajžilni volumen pogosto znižan, zato moramo aktivno iskati znake hipovolemije in se izogibati agresivni stimulaciji diureze.
- Prisotnost hematurije, zvišanega krvnega tlaka, zmanjšane delovanja ledvic, zunajledvične prizadetosti in pozitivne družinske anamneze govori v prid glomerulne patologije, ki ni idiopatski NS.
- Diferencialno diagnostično moramo pomisliti na druge bolezni, ki se kažejo z edemi.
- Pri otrocih z veliko verjetnostjo glomerulopatije z minimalnimi spremembami napravimo terapevtski poskus z glukokortikoidi in se tako večinoma izognemo ledvični biopsiji.

- Večina otrok z idiopatskim NS odgovori na zdravljenje z glukokortikoidi in ima kljub pogostim ponovnim zagonom dobro dolgoročno napoved izida bolezni.
- 10 % otrok z idiopatskim NS je odpornih na zdravljenje z glukokortikoidi. Ti otroci imajo večjo verjetnost razvoja kronične ledvične bolezni.

## LITERATURA

1. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003; 362 (9384): 629–39.
2. Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplant*. 2004; 8 (4): 344–8.
3. Vogt BA, Avner ED. Conditions particularly associated with proteinuria. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, et al, eds. *Nelson textbook of pediatrics*. 17th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 1751–7.
4. Hogg RJ, Portman RJ, Milliner D, et al. Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference of proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE). *Pediatrics*. 2000; 105 (6): 1242–9.
5. Hodson EM, Alexander SI. Evaluation and management of steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Curr Opin Pediatr*. 2008; 20 (2): 145–50.
6. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, et al. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics*. 2007; 119 (4): e907–19.
7. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International study of kidney disease in children. *Kidney Int*. 1978; 13 (2): 159–65.
8. Hochberg Z, Zelikovic I, Eisenstein I. *Practical algorithms in pediatric nephrology*. Haifa: Karger; 2008.
9. Reid CJ, Marsh MJ, Murdoch IM, et al. Nephrotic syndrome in childhood complicated by life threatening pulmonary oedema. *BMJ*. 1996; 312 (7022): 36–8.
10. Kerlin BA, Blatt NB, Fuh B, et al. Epidemiology and risk factors for thromboembolic complications of childhood nephrotic syndrome: a Midwest Pediatric Nephrology Consortium (MWPNC) study. *J Pediatr*. 2009; 155 (1): 105–10.
11. Ekka BK, Bagga A, Srivastava RN. Single-versus divided-dose prednisolone therapy for relapses of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1997; 11 (5): 597–9.
12. Hodson EM, Knight JF, Willis NS, et al. Corticosteroid therapy in nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Arch Dis Child*. 2000; 83 (1): 45–51.
13. Bagga A, Mantan M. Nephrotic syndrome in children. *Indian J Med Res*. 2005; 122 (1): 13–28.
14. Yap HK, Han EJ, Heng CK, et al. Risk factors for steroid dependency in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2001; 16 (12): 1049–52.
15. Constantinescu AR, Shah HB, Foote EF, et al. Predicting first-year relapses in children with nephrotic syndrome. *Pediatrics*. 2000; 105 (3 Pt1): 492–5.
16. Filler G, Young E, Geier P, et al. Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children? *Am J Kidney Dis*. 2003; 42 (6): 1107–13.
17. Bonilla-Felix M, Parra C, Dajani T, et al. Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children. *Kidney Int*. 1999; 55 (5): 1885–90.
18. Holmes KW, Kwiterovich PO Jr. Treatment of dyslipidemia in children and adolescents. *Curr Cardiol Rep*. 2005; 7 (6): 445–56.
19. Chandar J, Abitbol C, Montane B, et al. Angiotensin blockade as sole treatment for proteinuric kidney disease in children. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22 (5): 1332–7.
20. Schachter AD, Harmon WE. Single-center analysis of early recurrence of nephrotic syndrome following renal transplantation in children. *Pediatr Transplant*. 2001; 5 (6): 406–9.

Prispelo 9. 9. 2009

# MLINOTEST



■ **ZA ZDRAVO PREBAVO** sezite po zlata vredni **pirini JABLAN štruci** z vlakninami iz starodavne žitarice in jabolkami, z bogatim okusom pirinih jedrc in sončničnih semen. **Zlato priznanje GIZ sekcije pekarstva 2009!**

■ **ZA MANJ SOLI V PREHRANI** uživajte v kruhu polnega okusa, a z občutno manjšo vsebnostjo škodljivega natrija. Manj soli pomeni manj tveganja za zdravje! **Pirin NE'SOL hlebec** je na ocenjevanju GIZ sekcije pekarstva dosegel **čisto petico!** **Zlato, seveda.**

■ **ZA RES DOBRO DIETO** brez nepotrebnega odrekanja izberite **nizko GLIKEMIČNI kruh** z inovativno GLYX dietno recepturo. Z glikemičnim indeksom samo 38 zagotavlja občutek sitosti brez hitrega nihanja sladkorja v krvi. **Popolna novost med kruhi!**

■ **ZA MANJ HOLESTEROLA V KRVI** lahko zdaj dokazano poskrbite z uživanjem **aktivnega HOLESTE kruha!** S 4 rezinami na dan aktivno znižujete raven škodljivega holesterola. Vsaka rezina vsebuje 0,5 g sestavine Keimling activ. **Srce vam bo hvaležno!**



# svi

kruhi zdravega življenja

Barbara Segulin<sup>1</sup>, Monika Turk<sup>2</sup>

## Misli na srce

### UVOD

Za današnji čas je značilen vse bolj sedeč način življenja. A naše telo je ustvarjeno za gibanje. Če se ne gibamo, mišice oslabijo, sklepi otrdijo, krvni obtok postane len, vse bolj smo depresivni in že ob najmanjšem naporu smo ob sapo. Ob nezadostni telesni aktivnosti se bistveno poveča tudi tveganje za razvoj srčnožilnih bolezni (SŽB). Tveganje za razvoj koronarne srčne bolezni in s tem srčnega infarkta se tako poveča za 2-krat.

Srčnožilne bolezni predstavljajo velik problem – že skoraj stoletje so morilec številka ena v razvitem svetu! Vsak tretji človek umre za posledicami bolezni srca in ožilja, še večje pa je število tistih, ki imajo zaradi njih okrnjeno kvaliteto življenja. In število obolelih še vedno narašča. Ste že kdaj pomislili, kaj lahko storimo, da ustavimo ta naraščajoči trend? Nadobudna skupina študentov medicine se že nekaj let ukvarja s to problematiko.

### PROJEKT MISLI NA SRCE

Projekt Misli na srce je javnozdravstveni projekt v okviru Društva študentov medicine Slovenije (DŠMS), neprofitne in apolitične organizacije. Pri njem sodeluje okoli 40 aktivnih navdušenih prostovoljcev študentov medicine, ki v svojem prostem času ozaveščamo ljudi o boleznih srca in ožilja ter jih poskušamo motivirati za zdrav način življenja. Cilj projekta je dolgoročno zmanjšati obolevnost Slovencev za SŽB, naša vizija pa je Slovenija brez tovrstnih bolezni. Ciljamo predvsem na mlade, ki lahko z zdravim življenjskim slogom nastanek teh bolezni preprečijo. Člani projekta menimo, da se je najprej treba zavedati, da je za lastno zdravje in počutje odgovoren vsak sam in da je pomembno skrbeti za svoje zdravje, dokler ga imaš –

torej že danes, ne pa čakati na težave. Zdrav način življenja je kombinacija pravilne prehrane, redne in zadosti intenzivne telesne dejavnosti, duševnega ravnovesja ter ravnotežja med delom, sprostitvijo in počitkom. Vse omenjene sestavine so pri tem enako pomembne, torej le s pravilno prehrano in zanemarjanjem drugih stvari ne storimo dosti. Menimo pa, da lahko ljudje največ naredijo ravno v smeri večje telesne aktivnosti in zdrave prehrane. Cilje skušamo doseči z različnimi dejavnostmi, ki obravnavajo to tematiko z različnih zornih kotov in jih izvajamo skozi celo šolsko leto.

### TRADICIONALNI TEK

Naš največji dogodek je tradicionalni Tek Misli na srce. Gre za prireditev, ki poteka vsako leto sredi aprila v parku Tivoli ob Jakopičevem sprehajališču. Tako letos organiziramo že 5. Tek Misli na srce, in sicer 14. 4. 2010 od 15. do 20. ure, z namenom ozaveščanja javnosti o srčnožilnih boleznih in spodbujanje ljudi k zdravemu načinu življenja. V prvi vrsti želimo motivirati mlade, ki se jim zdi problem kroničnih bolezni preveč odmaknjen. Prireditev



<sup>1</sup> Barbara Segulin, štud. med., vodja projekta Misli na srce, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Monika Turk, štud. med., članica projekta Misli na srce, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana



Slika 1. Člani projekta *Misli na srce*.

je namenjena tudi starejšim in vsem, ki želijo sami narediti korak v smeri zdravega življenja. Namenjena je tako tekaškim začetnikom kot tudi že izkušenišim tekaškim mačkom. Tekači vseh starosti se bodo lahko preizkusili na progah dolgih 2, 4 in 10 km. Vsi bodo prejeli praktične spominske nagrade, najboljši še posebne nagrade, medalje in priznanja. Treba je poudariti, da bo tudi tokrat prireditev javna in v celoti brezplačna, kar pomeni, da štartnine ni. Na prizorišču bo potekalo pestro spremljevalno dogajanje, zato so vpljudno vabljeni tudi tisti, ki se nam ne bojo pridružili pri samem teku. Izvajali bomo akcijo ozaveščanja javnosti o SŽB, v sklopu katere bomo udeležencem brezplačno izmerili holesterol, krvni sladkor in tlak ter količino ogljikovega monoksida v izdihanem zraku. Člani projekta *Za življenje!*, ki je prav tako eden izmed projektov DŠMS, bodo na prizorišču udeležencem osvežili znanje oživljanja na lutki in jih naučili uporabljati avtomatski defibrilator.

Člani projekta *Misli na srce* si iz leta v leto prizadevamo izboljšati to prireditev in k zdravemu načinu življenjenja spodbuditi tako sta-

rejše kot mlajše. Ena izmed letošnjih zamisli je izvesti program, ki bi bil primeren tudi za otroke. Lansko leto se je teka udeležilo preko 1100 tekačev in še vsaj toliko obiskovalcev, letos pa pričakujemo dvakrat večji obisk.

Verjetno se sprašujete, zakaj smo se odločili ravno za tek. Tek je ena izmed telesnih aktivnosti, ki najbolj krepijo srčnožilni sistem in vse večje mišične skupine. Je najenostavnejši in najcenejši šport. Potrebna je primerna obutev in oblačila (glede na letni čas) ter dobra volja. Zanj ni potrebno predhodno znanje in nikoli ni prepozno začeti z njim. Tako upamo, da boste tudi vi – vsaj na dan našega teka – pomislili malo na svoje srce in se nam pridružili, da bomo lahko dober zgled drugim!

## PREDAVANJA

Naša naslednja dejavnost je organizacija mesečnih predavanj strokovnjakov s področja kardiologije, kardiokirurgije, sladkorne bolezni, hipertenzije, psihiatrije, zdrave prehrane in medicine športa. Z njimi želimo širiti znanje o srčnožilnih boleznih med študenti vseh fakul-



tet in jih seznaniti z najnovejšimi informacijami omenjenih področij, povezanih z našo tematiko. Do sedaj so že predavali: doc. dr. Tom Ploj, dr. med. (Nenadna srčna smrt), prof. dr. Borut Geršak, dr. med. (Kardiokirurško zdravljenje srčnožilnih bolezni), doc. dr. Andrej Janež, dr. med. (Sladkorna bolezen in srce), prof. dr. Rok Accetto, dr. med. (Povišan krvni tlak – kaj lahko storimo?), mag. Nada Rotovnik Kozjek, dr. med. (Klinična in športna prehrana ter zdrav življenjski slog), asist. dr. Danica Roter Pavlič, dr. med. (Izgorelostni sindrom), in Andrej Stare, dr. med. (Nenadna srčna smrt pri športniku – doping in srce). Predavanja so bila zelo dobro obiskana. Bodite pozorni na naša obvestila na spletni strani in ne zamudite naslednjih predavanj in izvrstnih predavateljev. Prvo bo že marca, ko bo doc. dr. Bojan Knap, dr. med., 17. 3. 2010 ob 17. uri v veliki predavalnici na Medicinski fakulteti predaval o zdravi prehrani. Gre za strokovnjaka za regeneracijo v procesu treninga, z dolgoletnimi izkušnjami pri svetovanju vrhunskim športnikom, ki je opravil tudi dvoletno usposabljanje pod tutorstvom Mednarodnega olimpijskega komiteja in je eden izmed dveh Slovencev, ki sta doslej prejela diplomu iz *Sports Nutrition*,

prav tako pa tudi redno sodeluje z olimpijsko reprezentanco Slovenije.

## SADNI DNEVI

Organiziramo tudi brezplačno zdravo malico za študente Medicinske fakultete – sadne dneve. Študentje si sadje lahko vzamejo v avli fakultete, skupaj z letaki, na katerih so napisani zdravi učinki sadja na telo in uporabni recepti za pripravo zdravih sadnih obrokov. Naš namen pri tej dejavnosti je spodbujanje samih študentov medicine k zdravemu življenjskemu slogu, saj menimo, da lahko le zdrav študent medicine in bodoči zdravnik zmore vse strese in obremenitve, ki jih od njega zahteva naporen študij in kasneje poklic. Hkrati pa je z lastnim dobrim zgledom lahko precej učinkovitejši pri spodbujanju ljudi k zdravemu načinu življenja in s tem preprečevanju srčnožilnih bolezni.

## DELAVNICE ZA SREDNJEŠOLCE

Obsežna študija o življenjskih navadah v Sloveniji, ki je bila narejena pred nekaj leti, je pokazala zaskrbljujoče podatke o nezdravem načinu življenja pri mladih. Zato smo sklenili



Slika 2. Tradicionalni Tek Misli na srce.



ukrepati tudi na tem področju in spremeniti trenutno situacijo. Naša dolgoletna želja je tako izvajanje delavnic o SŽB na srednjih šolah po sistemu vrstnik vrstniku, prevzetem po načelu Mednarodne zveze študentskih medicinskih društev (angl. *International Federation of Medical Students' Associations*, IFMSA). Ta pristop se je izkazal za zelo učinkovitega pri izobraževanju mladih. Delavnice smo snovali kar dve leti v sodelovanju s številnimi strokovnjaki z različnih področij. Sedaj lahko napovemo, da jih bomo konec marca letos že testirali na prvi srednji šoli in jih po temeljiti evalvaciji tudi uradno začeli izvajati. V ta namen smo v zadnjem tednu februarja 2010 organizirali obvezno strokovno šolanje za prihodnje izvajalce delavnic. Izvedli bomo tudi usposabljanje, kjer se bodo vsi izvajalci delavnic naučili veščin pravega pristopa k mladostniku. Na tak način bomo imeli izvrstno strokovno in pedagoško podlago, ki nam bo omogočala uspešen vstop v razrede srednjih šol. Kot lahko opazite, je pri našem projektu velik poudarek na strokovnosti. Uspešno sodelujemo z naslednjimi strokovnjaki: prof. dr. Deanom Ravnikom, dr. med., asist. mag. Neno Kopčavar Guček, dr. med., doc. dr. Lijano Zaletel-Kragelj, dr. med., izr. prof. dr. Fajkom Bajrovičem, dr. med., doc. dr. Zlatkom Frasom,

dr. med., dr. Katjo Ažman-Juvan, dr. med., Petrom Radšelom, dr. med., Markom Gričarjem, dr. med., Ivanom Radanom, dr. med., prof. dr. Borutom Geršakom, dr. med., dr. Majo Rus-Makovec, dr. med., doc. dr. Cirilo Hlastan-Ribič, dr. med., asist. Janet Klara Djomba, dr. med., asist. Andrejem Fabjanom, dr. med., prof. dr. Mirto Koželj, dr. med. in dr. Francko Lovšin Kozina s Pedagoške fakultete.

## ZAKLJUČEK

Za konec naj še enkrat poudarimo, da je projekt Misli na srce izredno aktiven prostovoljni projekt. Člane projekta družijo skupen cilj, v katerega ves čas verjamemo in v to smer tudi delujemo – to je: ustaviti epidemijo SŽB in izboljšati kvaliteto življenja prebivalcev Slovenije.

Življenje je eno samo in samo eno srce imamo, zato ga čuvajmo, dokler je še zdravo, da nam bo kvalitetno lahko služilo še mnoga leta.

Torej, (po)mislite na svoje srce in se nam pridružite!

Več informacij o nas in našem delovanju lahko najdete na spletni strani <http://srce.dsms.net> ali pa nam pišite na e-naslov: [srce@slomsic.org](mailto:srce@slomsic.org).

Sara Mugerli<sup>1</sup>

'Glasba začenja tam, kjer končuje beseda' (H. Heine)

## Poročilo s 40. koncerta zdravnikov

Besede smo za seboj pustili 4. decembra zvečer v Veliki dvorani Slovenske filharmonije, kjer so ljubljanski zdravniki ob nezanimarjivi pomoči študentov medicine že štiridesetič zapored pokazali svoje glasbene talente.

Dogodek je potekal v čast dvema žlahtnima obletnicama, in sicer 30-letnici delovanja Kulturno umetniškega društva Kliničnega centra in Medicinske fakultete dr. Lojz Kraigher in 20. Plečnikovemu memorialu, ko na naši fakulteti poteka mednarodni simpozij, podelijo pa se tudi nagrade študentom, ki so dosegli najvišje ocene pri treh predkliničnih predmetih: histologiji z embriologijo, anatomiji in patologiji. To so bili letos: Tanja Carli, Miha Čiringer, Sandra Frangež, Timotej Goričan, Maša Hafner, Špela Klemen, Matic Koren, Mateja Lasič, Jani Muha, Mihaela Pavlovič, Anja Praprotnik, Miha Simoniti, Jerica Škedelj in Ana Tomc.

V začetnem delu večera so moči združili Mešani pevski zbor dr. Bogdan Derč, zbor študentov medicine COR in vokalna skupina Kliničnega centra Vox medicorum. Vodil jih je zborovodja Venčeslav Zadravec, spremljali pa najprej Domagoj Jugović na orglah in nato orkester PRO MEDICO, sestavljen *ad hoc*, pod vodstvom Vilima Demšarja.

Sledili so nastopi ljubljanskega zdravniškega orkestra Camerata medica pod taktirko Andreja Ožbalta, Polone Maver in Andraža Cerarja na klavirju štiriročno ter zdravniške komorne skupine PRO MEDICO z Velikim klavirskim sekstetom.

Samostojno se je še enkrat predstavila vokalna skupina Vox medicorum, tokrat z dirigentom Tomažem Faganelom. Zatem so nas Andrej Gubenšek (violina), Janko Tominešek (harmonika), Jure Knez (kitara) in Klemen Dovč (kontrabas) ter Polona Maver (klavir) zazibali v ritmih tanga. Da smo dvorano zapustili prav zares plesno razpoloženi, pa je na koncu poskrbel Big Band Medicinske fakultete ob pomoči dirigenta Mitje Dragoliča in vokalistke Barbare Čokl.

Program sta sestavila Andraž Cerar in Polona Maver, vodila pa ga je prof. dr. Zvonka Zupanič Slavec. Skupaj z drugimi nastopajočimi si zaslužijo pohvale in občudovanje ne le za svoj trud, temveč tudi za to, ker uspešno dokazujejo, da se glasba in znanost nikakor ne izključujeta, ampak skupaj tvorita uravnoteženo celoto.

<sup>1</sup> Sara Mugerli, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

## 2. mednarodna poletna šola o Parkinsonovi bolezni za študente in diplomante zdravstvenih strok

*Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, 19.–28. 7. 2010*



**Parkinson Disease Summerschool**  
for Healthcare Students

V mesecu juliju bo na Medicinski fakulteti v Ljubljani potekala 2. mednarodna poletna šola o Parkinsonovi bolezni (PDSS). To je nova oblika izobraževanja, pri kateri so v ospredju sposobnosti študenta, potrebe pacienta in pridobivanje novih veščin na področju timskega dela. Pomeni aktivno sodelovanje udeležencev, razvijanje sposobnosti reševanja problemov, komunikacije in javnega nastopanja. Končni cilj tovrstnega izobraževanja je pripraviti inovativen predlog za raziskovalni projekt.

**Kaj PDSS v resnici je?** Devetdnevna poletna šola o Parkinsonovi bolezni za evropske študente in diplomante zdravstvenih strok: medicina, farmacija, psihologija, zdravstvena nega.

**Kaj se boste naučili?** Kako se vesti v multidisciplinarnem timu, kako napisati predlog za raziskovalni projekt, ki je relevanten za bolnike in strokovnjake z različnih področij zdravstva, kaj je znano in še neznano o Parkinsonovi bolezni, kakšne metode se uporabljajo za raziskovanje neznanega, nenazadnje tudi kako oceniti predlog za raziskovalni projekt. Pridobili boste tudi znanje s področja vodenja, obenem pa boste deležni tudi usmerjanja in vodenja s strani akademskih strokovnjakov in bolnikov.

**Zveni naporno ... Bo tudi zabavno?** Večeri bodo rezervirani za različne družabne dejavnosti. Na ta način boste bolje spoznali druge udeležence. Vmes pa se bo našel čas tudi za ogled nekatere slovenskih lepot, kot na primer Ljubljane, Idrije in arboretuma Volčji

potok. Trdo delaj in se zabavaj! PDSS je izživ, da delaš in razmišljaš bolj produktivno kot med študijskim letom. S predstavitvijo originalnega in inovativnega predloga za raziskovalni projekt pa lahko skupaj navdušimo bolnike, profesorje in sponzorje, kot to ni storil še nihče doslej!

**Organizatorji:** Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Nevrološka klinika Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Društvo Trepetlika.

**Potek PDSS:** Delali boste v manjših skupinah (4–5 študentov). Vsak dan boste pripravili predstavitev celodnevne dela drugim udeležencem in strokovnjakom (nevrologi, psihiatri, statistiki, fizioterapevti itd.).

**Učitelji:** Vodila vas bo posebej za to usposobljena ekipa, čeprav bo večina dela prepuščena vam. Vaše delo pa bo vsak dan ocenjeno s strani akademske stroke.

**Rezultat:** Med PDSS bo vsaka skupina (predvidenih je 6 skupin) pripravila inovativen in kreativen predlog za raziskovalni projekt.

**Nagrade:** Najboljši predlog za raziskovalni projekt bo prejel nagrado.

**Stroški:** 300 € zgodnja registracija, 450 € pozna registracija (vključuje 3 obroke dnevno, nastanitev in večerne aktivnosti). Stroški potovanja niso vključeni.

Za prijavo na poletno šolo obiščite našo spletno stran [www.parkinsonsummerschool.com](http://www.parkinsonsummerschool.com).

Za več informacij pišite na [klara.tostovrnik@gmail.com](mailto:klara.tostovrnik@gmail.com) ali pokličite na telefonsko številko 040 493 745.

## Uveljavitev strogega zakona o prepovedi kajenja v zaprtih javnih prostorih povezana s hitrim in znatnim zmanjšanjem pojavnosti akutnega srčnega infarkta

*Circulation, oktober 2009*

Pasivna izpostavljenost tobačnemu dimu (pasivno kajenje) poveča tveganje za pojav koronarne bolezni srca in akutnega srčnega infarkta. Na tem spoznanju temeljijo zakonska določila, ki v številnih državah zagotavljajo popolno prepoved kajenja v zaprtih javnih prostorih in na delovnih mestih. Uveljavljanje zakonov o prepovedi kajenja je v nekaterih okoljih ustvarilo naravni poskus za oceno zmanjšanja tveganja za pojav akutnega srčnega infarkta v skupnosti. Raziskovalci s Kalifornijske univerze v San Franciscu so z metaanalizo v strokovni literaturi objavljenih rezultatov potrdili opažanja iz tovrstnih raziskav, da je uveljavitev strogega zakona o prepovedi kajenja v zaprtih javnih prostorih povezana s hitrim in znatnim zmanjšanjem pojavnosti akutnega srčnega infarkta. Svoje ugotovitve so objavili v oktobrski številki revije *Circulation* (*Circulation* 2009; 120: 1373–9).

Zmanjšanje pojavnosti akutnega srčnega infarkta po uveljavitvi prepovedi kajenja so prvič zaznali v Heleni, glavnem mestu ame-

riške zvezne države Montana, kar je bilo leta 2003 predstavljeno na osrednjem zasedanju Znanstvenega srečanja *American College of Cardiology* (ACC 2003: Prepoved kajenja v javnih prostorih pomembno zmanjša pojavnost akutnega srčnega infarkta). Poleg tega poročila so raziskovalci v metaanalizo zajeli še 11 poročil, objavljenih v letih 2004–2008.

Analiza združenih podatkov je potrdila pomemben upad sprejema v bolnišnico zaradi akutnega srčnega infarkta po uveljavitvi prepovedi kajenja, glavni vzrok spremenljivosti rezultatov je bila različna dolžina opazovanega obdobja. V 12 mesecih se je tako pogostnost sprejema v bolnišnico zaradi akutnega srčnega infarkta zmanjšala za povprečno 17 % (razmerje tveganj 0,83; 95 % razpon zaupanja 0,80–0,87), korist pa se je s časom povečevala. Tak učinek prepovedi kajenja je skladen z ocenami zmanjšanja izpostavljenosti tobačnemu dimu in tveganja za posameznega prebivalca.

## Zdravljenje s folno kislino in vitaminom B12 povezano z večjo pojavnostjo raka

*The Journal of the American Medical Association, november 2009*

Zdravljenje s folno kislino in vitaminom B12 je bilo povezano z večjo pojavnostjo raka in večjo umrljivostjo zaradi vseh vzrokov, je pokazala analiza združenih podatkov norveških

randomiziranih kontroliranih raziskav NORVIT (ESC 2005: Zdravljenje z vitaminom B6 ali folatom ne preprečuje zapletov po srčnem infarktu (raziskava NORVIT)) in

WENBIT, v katerih so ovrednotili učinke zdravljenja z vitamini B v primerjavi s placebo pri bolnikih z ishemično boleznijo srca. Na Norveškem hrani ne dodajajo folata.

V obeh raziskavah je skupaj sodelovalo 6.837 bolnikov, ki so vitaminski pripravek prejeli v letih 1998–2005, sledili pa so jih do konca leta 2007, je zapisano v poročilu v novembrski številki revije *The Journal of the American Medical Association* (JAMA 2009; 302: 2119–26). Po naključnostnem izboru so bili razporejeni v skupine, ki so prejemale pripravek folne kisline, vitamina B6 in vitamina B12, pripravek folne kisline in vitamina B12, pripravek samo vitamina B6 ali placebo. Srednja koncentracija folata v serumu se je v skupinah, ki so prejemale folno kislino, povečala za 6-krat.

V srednjem času sledenja 39 mesecev med dvojno zaslepljenim zdravljenjem in 38 me-

secev po njegovem zaključku so raka na novo ugotovili pri 341 bolnikih (10,0%), ki so prejeli pripravek s folno kislino in vitaminom B12, in pri 288 bolnikih (8,4%), ki so prejeli pripravek brez teh dveh vitaminov (razmerje tveganj 1,12; 95% razpon zaupanja 1,03–1,41). Zaradi raka je v tem času umrlo 136 bolnikov (4,0%) oziroma 100 bolnikov (2,9%), razlika je bila prav tako pomenljiva v škodo zdravljenja s folno kislino in vitaminom B12 (1,38; 1,07–1,79). K rezultatom je največ prispevala večja pojavnost pljučnega raka pri bolnikih, ki so prejeli folno kislino in vitamin B12. Zdravljenje s pripravkom teh vitaminov je bilo povezano tudi s pomenljivo večjo umrljivostjo zaradi vseh vzrokov (16,1% proti 13,8%).

## **AHA 2009: zgodnje zvišanje koncentracije estradiola v cerebrospinalni tekočini označevalec boljšega izida po hudi nezgodni poškodbi možganov?**

*American Heart Association, november 2009*

Raziskave na poskusnih živalih so pokazale, da steroidni spolni hormoni vplivajo na stopnjo okvare in okrevanje po prehodni ishemiji in da dodajanje estrogena zagotavlja pomembno zaščito osrednjega živčevja (in v nekaterih primerih tudi do 65% boljše preživetje) v živalskih modelih možganske kapi, nezgodne poškodbe možganov, znotrajlobanjske krvavitve in zastoja srca. Zaščitni učinki estrogena se zdijo neodvisni od spola, vrste celic ali vrste poskusno povzročene okvare. Dr. Jane Wigginton iz bolnišnice *University of Texas Southwestern Medical Center* v Dallasu (ZDA) je tako napovedala skorajšnji pričetek vključevanja poškodovancev z nezgodno

poškodbo možganov v randomizirano raziskavo, ki bo proučila zaščitni učinek enega odmerka estrogena. V predavanju na Simpoziju o oživljanju, ki je potekal vzporedno z 82. znanstvenim srečanjem *American Heart Association* v Orlando, pa je predstavila prva spoznanja o časovni spremenljivosti koncentracije estradiola v cerebrospinalni tekočini v prvih 24 urah po poškodbi in njeni povezavi z izidom.

Koncentracije estradiola in drugih spolnih hormonov so izmerili v parnih vzorcih krvi in cerebrospinalne tekočine 11 odraslih poškodovancev z oceno po Glasgowski lestvici kome 3–8 pred vstavitvijo endotrahealne ga-

tubusa in/ali sedacijo in terapevtsko ventrikulostomijo. Vzorce krvi in cerebrospinalne tekočine so jemali do 24 ur.

Dr. Wiggingtonova je poudarila, da je pri zdravih posameznikih koncentracija estradiola v cerebrospinalni tekočini sorazmerna s koncentracijo estradiola v serumu in da le redko preseže desetino vrednosti koncentracije v serumu. Prvi in po njenih besedah zelo nepričakovani rezultati pa so pokazali, da (lahko) koncentracija estradiola v cerebrospinalni tekočini po poškodbi možganov za nekajkrat (tudi več 10-krat) preseže koncentracijo estradiola v serumu in da v 24 urah po poškodbi koncentraciji nista soodvisni. Razmerje med koncentracijami drugih spolnih steroidnih hormonov v cerebrospinalni tekočini in serumu se po poškodbi ni spreminjalo.

Rezultati nakazujejo, da utegne biti večje in zgodnejše zvišanje količnika koncentracij estradiola v cerebrospinalni tekočini in serumu povezano z boljšim kratkoročnim izi-

dom, česar pa zaradi majhnega števila poškodovancev v tej raziskavi seveda ni bilo mogoče zanesljivo opredeliti. Mehanizem ostaja neznan, zvišanje koncentracije estradiola v cerebrospinalni tekočini v teh okoliščinah bi utegnilo biti posledica tvorbe estradiola v osrednjem živčevju ali aktivnega transporta estradiola iz krvi v cerebrospinalno tekočino.

Vprašanja po predstavitvi so bila številna. Dr. Wiggingtonova je pritrdila enemu od razpravljavcev, da bi utegnilo biti zvišanje koncentracije estradiola povezano z okvaro hemodinamike in visokim znotrajlobanjskim tlakom, in povedala, da se v raziskavah glede vira estradiola v možganih osredotočajo na astrocite. Poleg majhnega števila poškodovancev je kot pomanjkljivost raziskave izpostavila metodo merjenja koncentracije estradiola, ki ni preverjena za cerebrospinalno tekočino, in manjkajoče podatke pri nekaterih poškodovancih zaradi zgodnje odstranitve ventrikulostome.

## **AHA 2009: strah pred nezadostno usposobljenostjo ali povzročitvijo škode najpogostejša pomisleka glede izvajanja temeljnih postopkov oživljanja**

*American Heart Association, november 2009*

Strah, da za oživljanje niso dovolj usposobljeni ali da bi z njim povzročili škodo, sta glavna razloga, zaradi katerih bi nekateri posamezniki kljub opravljenemu tečaju temeljnih postopkov oživljanja opustili pomoč pri zastoju srca, so v plakatu, predstavljenem v okviru Simpozija o oživljanju, ki je potekal vzporedno z 82. znanstvenim srečanjem *American Heart Association* v Orlandu, zapisali italijanski raziskovalci iz bolnišnice San Matteo v Pavii.

Raziskovalci so vsem posameznikom, ki so se udeležili tečaja temeljnih postopkov oživljanja v času od januarja 2008 do februarja 2009, razposlali vprašalnik z vprašanjem, ali bi izvajali oživljanje v primeru, da bi bili priča zastoja srca pri odraslem ali pri otroku. Preiskovance, ki so odgovorili nikalno, so pozvali k razkritju razlogov. Preiskovanci, ki so na vprašalnik odgovorili anonimno, so bili večinoma moški (77,7%), nekaj več kot 40 %

jih je bilo starih 26–35 let, nekaj več kot 60 % jih je imelo visoko izobrazbo.

V končno analizo so zajeli odgovore 1.000 preiskovancev. Deleža tistih, ki bi izvajali temeljne postopke oživljanja pri neznanem odraslem oziroma otroku, sta bila 86,2 % oziroma 73,9 %. Kot razlog opustitve pomoči odraslemu bolniku z zastojem srca je 30,2 % preiskovancev navedlo strah pred povzročitvijo škode, 15,9 % strah pred nezadostno usposobljenostjo, 14,3 % strah pred okužbo in 12,7 % strah pred pravnimi posledicami.

Pomoč otroku bi zaradi teh razlogov opustilo 41,2 %, 36,8 %, 3,4 % in 2 %. Starost in spol na odločitve o izvajanju temeljnih postopkov oživljanja nista imela vpliva.

Raziskovalci so mnenja, da je delež usposobljenih posameznikov, ki bi izvajali temeljne postopke oživljanja, premajhen. V tečaje temeljnih postopkov oživljanja bi bilo po njihovem mnenju umestno vključiti tudi razpravo o teh razlogih, zasnovano tako, da bi kar najbolj zmanjšala delež obotavljivih posameznikov.

## Upokojitev ublaži dozdevno breme slabega zdravja in zdravstvenih težav

*Lancet, december 2009*

Dozdevno breme slabega zdravja in zdravstvenih težav se z upokojitvijo znatno ublaži pri vseh skupinah delavcev, razen tistih z idealnimi pogoji dela, je v prospektivni kohortni raziskavi ugotovila skupina skandinavskih, francoskih in britanskih raziskovalcev. Skupina je v decembrski številki revije *Lancet* (*Lancet* 2009; 374: 1889–96) objavila poročilo o izsledkih raziskave, v kateri je z rednimi letnimi pregledi v obdobju 1989–2007 sledila 14.714 delavcev francoskega državnega energetskega podjetja *Electricité de France-Gaz de France* do 7 let pred in 7 let po upokojitvi.

Delež preiskovancev, ki so tožili zaradi neoptimalnega zdravstvenega stanja, je naraščal s starostjo. Analize pa so pokazale, da se

je v času od leta pred do leta po upokojitvi razširjenost neoptimalnega zdravstvenega stanja zmanjšala z 19,2 % na 14,3 %, kar je glede na zbrane podatke pomenilo izboljšanje ocene zdravja na raven 8–10 let poprej. Učinek upokojitve je bil očiten tako pri moških kot pri ženskah in v vseh skupinah delavcev, vztrajal je vseh 7 let sledenja po upokojitvi. Slabo delovno okolje in zdravstvene težave pred upokojitvijo so bile povezane s hitrejšim naraščanjem razširjenosti dozdevnega slabega zdravja in večjim izboljšanjem po upokojitvi. Raziskovalci pa so opozorili, da učinka upokojitve niso ugotovili pri delavcih z visokim položajem in visoko stopnjo zadovoljstva z delom.

## Zdravljenje z nizkoenergijskim laserjem ublaži bolečino v vratu

*Lancet, december 2009*

Zdravljenje z nizkoenergijskim laserjem, tj. obsevanje bolečih točk z laserskim žarkom, ki ne ogreva tkiva, je razmeroma malo uporabljana metoda blaženja bolečine v vratu. Rezultati sistematičnega pregleda literature z metaanalizo izbranih raziskav, objavljeni v decembrski številki revije *Lancet* (Lancet 2009; 374: 1897–908), kažejo, da ta metoda ublaži bolečino v vratu neposredno po zdravljenju in do 22 tednov po njegovem zaključku.

Mednarodna skupina raziskovalcev je s poizvedbami po elektronskih bibliografskih zbirkah in drugih virih našla poročila o 16 randomiziranih kontroliranih raziskavah, ki so primerjale zdravljenje z nizkoenergijskim laserjem katere koli valovne dolžine in zdravljenje s placebom pri bolnikih z akutno ali kronično bolečino v vratu. V raziskavah je sodelovalo skupaj 820 bolnikov, njihova povprečna starost je bila  $43 \pm 9,8$  let, le približno petina je bila moških. Povprečno trajanje simptomov je bilo  $90 \pm 36,9$  mesecev, povpreč-

na vrednost izhodiščne ocene bolečine pa  $56,9 \pm 7,5$  mm.

Analiza združenih podatkov 2 raziskav pri bolnikih z akutno bolečino v vratu je pokazala, da je bila verjetnost za izboljšanje po zdravljenju z nizkoenergijskim laserjem 1,69-krat večja kot po zdravljenju s placebom (95 % razpon zaupanja 1,22–2,33). Podobna analiza podatkov 5 raziskav z bolniki s kronično bolečino v vratu je pokazala, da je bila verjetnost za izboljšanje po zdravljenju z nizkoenergijskim laserjem večja za več kot 4-krat. V 11 raziskavah, v katerih so učinek zdravljenja na bolečino ocenjevali s 100 mm vidno analogno lestvico, je zdravljenje z nizkoenergijskim laserjem ublažilo bolečino za povprečno 19,86 mm (95 % razpon zaupanja 10,04–29,68 mm) več kot zdravljenje s placebom. Podatki iz 7 raziskav so pokazali, da je izboljšanje vztrajalo do 22 tednov po zaključku zdravljenja.

## Uporaba hitrih testov za virusne okužbe pri otrocih z okužbo zgornjih dihal obeta zmanjšanje predpisovanja antibiotikov

*Cochrane Database of Systematic Reviews, december 2009*

Otrokom, ki jih zaradi simptomov gripi podobne bolezni ali okužbe zgornjih dihal obravnavajo na urgentnem oddelku, kljub izvidom različnih diagnostičnih preiskav nemalokrat predpišejo antibiotik kot varnostni ukrep. Taka praksa pomeni ne samo stroškovno breme temveč tudi nesmotrno rabo antibiotikov. Sistematičen pregled literature

z metaanalizo izbranih raziskav, ki ga je v okviru *Cochrane Collaboration* opravila mednarodna skupina raziskovalcev, je nakazal korist uporabe hitrih testov za virusne okužbe v teh okoliščinah. Poročilo o ugotovitvah je bilo objavljeno v četrti letošnji izdaji *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Cochrane Database Syst Rev 2009; 4: CD006452).



Izčrpne poizvedbe po elektronskih bibliografskih zbirkah, registrih randomiziranih kontroliranih raziskav in drugih virih so odkrile 1 nepopolno randomizirano in 3 randomizirane kontrolirane raziskave, v katere je bilo zajetih skupaj 1.588 poprej zdravih otrok z okužbo zgornjih dihal. Skupaj 759 otrokom so opravili hitre teste za virusne okužbe, skupaj 829 otrok iz kontrolnih skupin pa je bilo deležnih običajne obravnave.

Rezultati so pokazali, da je bila uporaba hitrih testov za virusne okužbe povezana s številsko, vendar ne statistično pomenljivo manjšim predpisovanjem antibiotikov in manjšim številom laboratorijskih preiskav krvi in seča. Trajanje obravnave na urgentnem oddelku je bilo ob uporabi hitrih testov za virusne okužbe podobno kot ob običajni obravnavi. Pogost-

nost rentgenskega slikanja prsnega koša pa se je ob uporabi hitrih testov vendarle zmanjšala za nekaj manj kot četrtino (razmerje pogostnosti 0,77; 95 % razpon zaupanja 0,65–0,91).

Raziskovalci so zaključili, da obstoječi dokazi ne omogočajo dokončne presoje koristi hitrih testov za virusne okužbe v preprečevanju predpisovanja antibiotikov otrokom z okužbo zgornjih dihal, vendar so rezultati dosedanjih raziskav po njihovem prepričanju obetavni. V metaanalizo vključene raziskave niso imele ustrezne statistične moči, kar je po mnenju raziskovalcev vzrok za nekatera protislovja v rezultatih. Resnično korist tega ukrepa bi bilo treba zato ovrednotiti v randomizirani kontrolirani raziskavi z ustreznim številom bolnikov.

## Serumska koncentracija natriuretičnega peptida napovednik srčno-žilnih dogodkov

*Circulation, december 2009*

Raziskave *in vitro* so pokazale, da se natriuretični peptidi izločajo iz srčnomišičnih celic tudi v odgovor na ishemijo, zato nekateri menijo, da njihova koncentracija v krvi lahko odraža ogroženost zaradi vseh srčno-žilnih dogodkov in ne samo zaradi srčnega popuščanja. Sistematičen pregled literature z metaanalizo 40 izbranih raziskav z dolgotrajnim sledenjem je potrdil, da bi bilo umestno to povezavo raziskati v velikih populacijskih raziskavah. Skupina britanskih in islandskih raziskovalcev je ugotovitev pregleda objavila v decembrski številki revije *Circulation* (*Circulation* 2009; 120: 2177-87).

S poizvedbami po elektronskih bibliografskih zbirkah in drugih virih so raziskovalci zbrali podatke o raziskavah, v katerih so poročali o povezavi med koncentracijo natriuretičnega peptida tipa B (BNP) ali njegovega

N-končnega propeptida (NT-proBNP) in pojavnostjo usodnega ali neusodnega srčnega infarkta, možganske kapi, prehodnega ishemičnega napada in srčnega popuščanja. Merilom za vključitev v metaanalizo, ki so vključevala tudi sledenje vsaj 1 leto, je ustrezalo 40 raziskav s skupaj 87.474 preiskovanci, ki so bili izbrani bodisi iz celotne populacije bodisi glede na večjo ogroženost zaradi dejavnikov tveganja ali obstoječo srčno-žilno bolezen.

V povprečno približno 5 letih sledenja je bilo zabeleženih skupaj 10.625 opazovanih srčno-žilnih dogodkov. Statistična analiza, v kateri so izločili vpliv poglobitnih srčno-žilnih dejavnikov tveganja, je pokazala, da je bilo tveganje za pojav katerega teh dogodkov v tretjini z največjimi vrednostmi skoraj 3-krat večje kot v tretjini z najmanjšimi vred-

nostmi koncentracije natriuretičnega peptida (relativno tveganje 2,82; 95 % razpon zaupanja 2,40–3,33). Enaka analiza, ki so jo omejili na 6 raziskav z vsaj 250 opazovanimi dogodki (kar naj bi po prepričanju raziskovalcev zmanjšalo vpliv pristranskosti pri beleženju opazovanih dogodkov iz manjših raziskav), je razkrila podobno razmerje med skrajnima tretjinama po vrednosti koncentracije natriuretičnega peptida razslojenih preiskovancev

(relativno tveganje 1,94; 95 % razpon zaupanja 1,57–2,39). Napovedna vrednost BNP in NT-proBNP je bila podobna, izhodiščna stopnja srčno-žilne ogroženosti nanjo ni imela vpliva. Vključitev koncentracije natriuretičnega peptida v izračun srčno-žilne ogroženosti na podlagi poglavitnih dejavnikov tveganja je zmerno izboljšala prepoznavanje ogroženih posameznikov.

## Cepivo proti pandemski gripi A H1N1 močno imunogeno pri odraslih

*Lancet, januar 2010*

En odmerek cepiva proti pandemski gripi A H1N1 je bil močno imunogen pri odraslih, so pokazali izsledki dveh randomiziranih kontroliranih raziskav, ki so ju izpeljali v 35 središčih v ZDA. Ti raziskavi kažeta, kot je zapisano v poročilu v januarški številki revije *Lancet* (*Lancet* 2010; 375: 41–8), da utegne odraslim zagotavljati zadostno zaščito pred okužbo s tem virusom že 1 odmerek, za otroke, mlajše od 9 let, pa sta najbrž potrebna 2 odmerka. V isti številki revije sta bili objavljeni še dve poročili o raziskavah cepiva proti tej vrsti gripe.

Raziskavi sta zajeli zdrave prostovoljce. V prvi raziskavi je sodelovalo 497 preiskovancev, starih 18–64 let, in 352 odraslih, starih vsaj 65 let, ki so po naključnostnem izboru prejeli odmerek cepiva s 7,5 µg, 15 µg oziroma 30 µg hemaglutinina ali placebo, v drugi raziskavi pa je sodelovalo 229 otrok, starih 6–35 mesecev, in 245 otrok, starih 3–9 let, ki

so prejeli odmerek cepiva s 7,5 µg in 15 µg hemaglutinina ali placebo. Odmerek cepiva oziroma placebo (fiziološka raztopina soli) so otroci, mlajši od 1 leta, prejeli v stegno, ostali preiskovanci pa v deltoidno mišico. Glavno merilo učinkovitosti v obeh raziskavah je bila raven protiteles, ki zavirajo hemaglutinacijo, 21 dni po cepljenju.

Ob tem časovnem mejniku so zaščitni titer protiteles (vsaj 1:140) izmerili pri 45–50 % otrok, starih 6–35 mesecev, 69–75 % otrok, starih 3–9 let, 95–100 % odraslih, starih 18–64 let, in 93–95 % odraslih, starih vsaj 65 let. Po cepljenju niso v nobeni skupini zabeležili nobenega s cepivom povezanega resnega neželenega učinka. O reakciji na mestu cepljenja ali sistemski reakciji je poročala približno polovica preiskovancev v vsaki starostni skupini, med aktivno cepljeno in placebo skupino v pojavnosti teh reakcij ni bilo razlik.

## Zobozdravstveni poseg ne poveča tveganja za okužbo popolne endoproteze kolka ali kolena

*Clinical Infectious Diseases, januar 2010*

Zobozdravstveni posegi ne predstavljajo povečanega tveganja za okužbo popolne endoproteze kolka ali kolena, zato preprečevalno zdravljenje z antibiotiki v teh okoliščinah ni potrebno, so v raziskavi primerov s kontrolami ugotovili ameriški raziskovalci iz *Mayo Clinic College of Medicine* v Rochestru in drugih središč v ZDA. Poročilo o izsledkih so objavili v januarški številki revije *Clinical Infectious Diseases* (Clin Infect Dis 2010; 50: 8–16).

Raziskovalci so proučili podatke za 339 bolnikov z okužbo popolne endoproteze kolka ali kolena in 339 po demografskih in kliničnih značilnostih ustreznih kontrolnih bolnikov brez tovrstne okužbe. Vsi bolniki so bili

obravnavani v 1 terciarnem središču v letih 2001–2006. Statistična analiza, v kateri so izločili vpliv morebitnih zavajajočih dejavnikov, je pokazala, da zobozdravstveni poseg (z velikim ali majhnim tveganjem), ki so ga opravili brez preprečevalnega zdravljenja z antibiotikom, ni bil povezan z večjo pojavnostjo okužb endoproteze. Razmerje obovetov za okužbo v primerjavi z bolniki, ki jim niso opravili zobozdravstvenega posega, je bilo 0,8 (95 % razpon zaupanja 0,4–1,6). Preprečevalno zdravljenje z antibiotiki ob zobozdravstvenem posegu na tveganje za okužbo endoproteze ni imelo statistično ali klinično pomembnega vpliva.

## Seznam diplomantov, ki so diplomirali na Medicinski fakulteti od 1. oktobra do 31. decembra 2009

### Diplomanti medicine

Furlan Matej	02. 10. 2009	Štukl Sever Marta	18. 11. 2009
Abdulhalikova Dzhamilyat	06. 10. 2009	Vrščaj Sara	18. 11. 2009
Čufer Miha	07. 10. 2009	Tušek Nina	23. 11. 2009
Logar Darja	08. 10. 2009	Bizjak Mojca	24. 11. 2009
Riđić Anita	09. 10. 2009	Krajšek Nuša	24. 11. 2009
Osolnik Jasna	14. 10. 2009	Peček Blaž	24. 11. 2009
Kalač Lea	20. 10. 2009	Gerčar Polona	25. 11. 2009
Gantar Eva	21. 10. 2009	Kotnik Oven Goran	02. 12. 2009
Gornik Petra	21. 10. 2009	Osredkar David	02. 12. 2009
Hajdinjak Emina	21. 10. 2009	Bauman Peter	08. 12. 2009
Stušek Andreja	22. 10. 2009	Šustar Marijan	08. 12. 2009
Herceg Azra	28. 10. 2009	Dolinar Urška	09. 12. 2009
Komel Urška	28. 10. 2009	Turšič Tadeja	15. 12. 2009
Maver Polona	28. 10. 2009	Ambrožič Miha	16. 12. 2009
Azarija Jelena	02. 11. 2009	Košir Renata	16. 12. 2009
Kerin Viktorija	04. 11. 2009	Oblak Manca	16. 12. 2009
Kramar Nika	04. 11. 2009	Tonkli Alenka	16. 12. 2009
Fakin Ana	10. 11. 2009	Resman Anže	21. 12. 2009
Hrovatič Podvršnik Nataša	10. 11. 2009	Groboljšek Mateja	23. 12. 2009
Glavan Matic	11. 11. 2009		

### Diplomanti dentalne medicine

Pavlovič Krunoslav	14. 10. 2009	Keše Neža	01. 12. 2009
Hribar Sašo	02. 11. 2009	Pevec Urška	07. 12. 2009
Dolinar Tomaž	17. 11. 2009	Dolinar Bizjak Maja	08. 12. 2009
Abramič Ivana	19. 11. 2009	Hropot Nina	15. 12. 2009
Hrastovšek Nika	20. 11. 2009	Osovnikar Matic	18. 12. 2009
Kasjak Andreja	24. 11. 2009	Klaj Jure	23. 12. 2009

# Navodila sodelavcem Medicinskih razgledov

Uredništvo sprejema v obdelavo samo članke, ki še niso bili in ne bodo objavljeni drugje. Dele članka, ki so povzeti po drugi literaturi (predvsem slike in tabele) mora spremljati dovoljenje avtorja in založnika prispevka za reprodukcijo.

Navodila so v skladu z *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. Popolna navodila so objavljena na spletnem naslovu: <http://www.icmje.org/>.

## AVTORSTVO

Avtorji morajo izpolnjevati pogoje za avtorstvo. Prispevati morajo k zasnovi in oblikovanju oziroma analizi in interpretaciji podatkov, članek morajo intelektualno zasnovati oziroma ga kritično pregledati, strinjati se morajo s končno verzijo članka. Samo zbiranje podatkov ne zadostuje za avtorstvo.

Prispevku priložite izjavo o avtorstvu in avtorskih pravicah, ki je objavljena na spletni strani revije <http://www.medrazgl.si>. Izjavo morajo lastnoročno podpisati vsi avtorji. Dokler izjave ne prejmemo, prispevka ne bomo uvrstili v uredniški postopek. V sprememnem pismu naj bo naveden odgovorni avtor (s polnim naslovom, telefonsko številko in elektronskim naslovom), ki bo skrbel za komunikacijo z uredništvom in ostalimi avtorji. Kakršnekoli spremembe v avtorstvu članka (po oddaji članka v uredništvo) morajo s podpisom potrditi vsi avtorji prvotno oddanega članka.

## ETIČNA NAČELA

Pri prispevkih, ki obravnavajo raziskave na ljudeh, mora biti iz besedila razvidno, da so bile raziskave opravljene v skladu z načeli Helsinško-tokijske deklaracije. Pri prispevkih, ki obravnavajo poskuse na živalih, mora biti iz besedila razvidno, da so bili opravljeni v skladu z etičnimi načeli.

## TIPKOPIS

Prispevke pošljite na naslov uredništva: Medicinski razgledi, Korytkova 2, 1000 Ljubljana. Pošljite natisnjeno verzijo prispevka, datoteko prispevka na zgoščenki in originalne sli-

ke. Tipkopis naj bo natisnjen na belem pisarniškem papirju (pisava Times New Roman, velikost črk 12 pt, razmik med vrsticami 1,5, širina robov najmanj 25 mm), obsega naj največ 30 strani. Zgoščenka naj bo označena s priimkom prvega avtorja in imenom prispevka. Prispevke lahko pošljete tudi po elektronski pošti na naslov [info@medrazgl.si](mailto:info@medrazgl.si).

**Naslovna stran** naj obsega naslov članka v slovenskem in angleškem jeziku. Naslov naj bo kratek in natančen, opisen in ne trdilen (povedi v naslovih niso dopustne). Navedena naj bodo imena piscev z natančnimi akademskimi in strokovnimi naslovi ter popoln naslov ustanove, inštituta ali klinike, kjer je delo nastalo. Avtorji, ki so v objavo poslano raziskovalno delo opravili s pomočjo določenega podjetja, naj le-to tu navedejo.

**Izvleček in ključne besede.** Druga stran naj obsega izvleček v slovenskem in angleškem jeziku. Izvleček naj obsega 150 do 250 besed. Izvleček raziskovalnega članka naj bo strukturiran (izhodišča, metode, rezultati, zaključki), izvlečki ostalih člankov naj bodo nestrukturirani. V izvlečku naj bo predstavljen osnovni namen članka, vsebinsko naj povzema in ne le našteva bistvene vsebine dela. Izvleček ne sme vsebovati kratic in okrajšav. Avtorji naj navedejo do sedem ključnih besed, ki natančneje opredeljujejo vsebino prispevka.

**Struktura članka.** Raziskovalni članki naj bodo členjeni na naslednja poglavja: izhodišča, metode, rezultati, razpravljanje in zaključki. Pregledni članki in primeri iz klinične prakse so lahko zasnovani drugače, vendar naj bo razdelitev na poglavja in podpoglavja jasno razvidna.

**Tabele** naj bodo vstavljene v besedilo članka na mestu, kamor sodijo. Ločeno jih oštevilčite po vrstnem redu, vsaka tabela mora biti navedena v besedilu. Pod tabelo sodi besedilo, ki naj vsebuje kratek naslov, v njem naj bodo pojasnjene tudi vse kratice, okrajšave in nestandardne enote, ki se pojavljajo v tabeli.

**Slike** morajo biti profesionalno izdelane ali fotografirane. Če so slike priložene v digitalni obliki, naj bodo zadostne kakovosti za tisk. Fotografije iz radioloških posnetkov in diapozitivov naj priskrbi avtor sam. Oddajte originalne slik oziroma fotografije, slik ne skenirajte sami. Črke, številke ali simboli na sliki morajo biti jasni, enotni in dovolj veliki, da so berljivi tudi na pomanjšani sliki. Fotografijam, na katerih se lahko prepozna identiteta bolnika, priložite pisno dovoljenje bolnika.

Na zadnji strani slike naj bo napisana zaporedna številka slike, ime prvega avtorja in naslov članka, v dvomljivih primerih naj bo označeno, kaj je na sliki zgoraj oziroma spodaj. Slike v digitalni obliki naj imajo zaporedno številko slike ter ime prvega avtorja.

Vsaka slika mora biti navedena v besedilu. Besedilo k sliki naj se nahaja v članku na mestu, kjer naj bi slika bila. Vsebuje naj zaporedno številko slike, naslov slike in potrebno razlago vsebine. Slika mora biti razumljiva, tudi brez branja ostalega besedila. Pojasniti morate vse okrajšave s slike.

**Merske enote** naj bodo v skladu z mednarodnim sistemom enot (SI).

**Kratic in okrajšav** naj v besedilu ne bo preveč, saj se lahko izgubi preglednost nad njimi. Izjema so mednarodno veljavne oznake merskih enot in splošno uveljavljene okrajšave (npr. DNA, EKG ipd.). V naslovih in izvlečku naj ne bo kratic. Na mestu, kjer se kratica prvič pojavi v besedilu, naj bo le-ta polno izpisana, kratica pa naj bo napisana v oklepaju.

**Literatura.** Vsako navajanje trditev ali dognanj drugih morate podpreti z referenco. Reference naj bodo v besedilu navedene po vrstnem redu, tako kot se pojavljajo. Referenca naj bo navedena na koncu citirane trditve. Reference v besedilu, slikah in tabelah navedite ležeče v oklepaju z arabskimi številkami. Reference, ki se pojavljajo samo v tabelah ali slikah, naj bodo oštevilčene tako, kot se bodo pojavile v besedilu. Osebni dogovori (lahko je navedeno v besedilu) naj ne bodo navedeni kot reference. Seznam citirane literature naj bo na koncu prispevka. Literaturo citirajte po navodilih, ki so v skladu s tistimi, ki jih uporablja ameriška *National Library of Medi-*

*cine* v *Index Medicus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=citmed>). Imena revij krajšajte tako, kot določa *Index Medicus* (popoln seznam je objavljen na spletnem naslovu <http://www.nlm.nih.gov/>).

V citatu navedite vse avtorje. V primeru, da so avtorji več kot trije, navedite le prve tri in pripišite »et al«. Isto velja za navajanje urednikov knjig.

Primeri:

• **članek v reviji:**

Petek Šter M, Švab I. Bolniki s sočasnimi boleznimi v družinski medicini. *Med Razgl.* 2008; 48 (2): 205–11.

Bajuk Studen K, Preželj J, Kocjan T, et al. Mehanizmi srčno-žilne ogroženosti žensk s sindromom policističnih ovarijev. *Zdrav Vestn.* 2009; 78: 129–35.

Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, et al. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol.* 2005; 62 (1): 112–6.

• **članek v reviji, kjer je avtor organizacija:**

American Diabetes Association. Diabetes update. *Nursing.* 2003; Suppl: 19–20, 24.

• **volumen s suplementom:**

Vesel S. Spremembe na srcu pri Kawasakijski bolezni. *Med Razgl.* 2002; 41 Suppl 2: 139–43.

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1994; 102 Suppl 2: 275–82.

• **številka s suplementom:**

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol.* 1996; 23 (1 Suppl 2): 89–97.

• **posamezni deli članka (izvlečki, pisma uredništvu ipd.):**

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [izvleček]. *Kidney Int.* 1992; 42: 1285.

Jackson B, Fleming T. A drug is effective if better than a harmless control [pismo uredništvu]. *Nature.* 2005; 434 (7037): 1067.

- **knjiga:**

Ahčan U. Prva pomoč: priručnik s praktičnimi primeri. Ljubljana: Rdeči križ Slovenije; 2007.

Jenkins PF. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York: Oxford University Press; 2005.

Eyre HJ, Lange DP, Morris LB. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; c2002.

Advanced Life Support Group. Acute medical emergencies: the practical approach. London: BMJ Books; 2001.

- **poglavje v knjigi:**

Možina M, Jamšek M, Šarc L, et al. Zastrupitve. In: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D, eds. Interna medicina. Ljubljana: Littera picta; 2005. p. 1143–507.

Rojko JL, Hardy WD Jr. Feline leukemia virus and other retroviruses. In: Sherding RG, ed. The cat: diseases and clinical management. New York: Churchill Livingstone; 1989. p. 229–332.

Kone BC. Metabolic basis of solute transport. In: Brenner BM, Rector FC, eds. Brenner and Rector's the kidney. 8th ed. Vol. 1. Philadelphia: Saunders Elsevier; c2008. p. 130–55.

- **poročila s kongresov:**

Ferreira de Oliveira MJ, ed. Accessibility and quality of health services. Proceedings of the 28th Meeting of the European Working Group on Operational Research Applied to Health Services (ORAHS); 2002 Jul 28–Aug 2; Rio de Janeiro, Brazil. Frankfurt (Germany): Peter Lang; c2004.

10th International Psoriasis Symposium; 2004 Jun 10–13; Toronto, ON. Chicago: Skin Disease Education Foundation; 2004.

Rice AS, Farquhar-Smith WP, Bridges D, et al. Canabinoids and pain. In: Dostorovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, eds. Proceedings of the 10th World Congress on Pain; 2002 Aug 17–22; San Diego, CA. Seattle (WA): IASP Press; c2003. p. 437–68.

- **doktorska in magistrska dela, raziskovalne naloge:**

Šabovič M. Mehanizem fiziološkega in farmakološkega raztapljanja krvnih strdkov [doktorsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1992.

Liu-Ambrose TY. Studies of fall risk and bone morphology in older women with low bone mass [doktorsko delo]. Vancouver (BC): University of British Columbia; 2004.

Weisbaum LD. Human sexuality of children and adolescents: a comprehensive training guide for social work professionals [magistrsko delo]. Long Beach (CA): California State University, Long Beach; 2005.

- **pravne listine in zakoni:**

Zakon o zdravniški službi 1999. Uradni list RS št. 98/1999.

- **internetna stran:**

AMA: helping doctors help patients [internet]. Chicago: American Medical Association; c1995–2007 [citirano 2007 Feb 22]. Dosegljivo na: <http://www.ama-assn.org/>

- **članek na internetu:**

Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol [internet]. 2006 [citirano 2007 Jan 5]; 27 (1): 34–7. Dosegljivo na: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>

- **knjiga na internetu:**

Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al., eds. Harrison's online [internet]. 16th ed. Columbus (OH): McGraw-Hill Companies; c2006 [citirano 2006 Nov 20]. Dosegljivo na: <http://www.accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=4>

- **podatkovna baza na internetu:**

Online Archive of American Folk Medicine [internet]. Los Angeles: Regents of the University of California. 1996 [citirano 2007 Feb 1]. Dosegljivo na: <http://www.folkmed.ucla.edu/>

- **članek na CD-ju, DVD-ju ipd.:**

Kauffman CA, Bonilla HF. Trends in antibiotic resistance with emphasis on VRE. FPR [CD-ROM]. 1998; 20 (10).

- **knjiga na CD-ju, DVD-ju ipd.:**

Kacmarek RM. Advanced respiratory care [CD-ROM]. Verzija 3.0. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000.

- **računalniški program na CD-ju, DVD-ju ipd.:**

Meader CR, Pribor HC. DiagnosisPro: the ultimate differential diagnosis assistant [CD-ROM]. Verzija 6.0. Los Angeles: MedTech USA; 2002.

- **neobjavljeni prispevek:**

Laking G, Lord J, Fischer A. The economics of diagnosis. Health Econ. V tisku 2006.

## **UREDNIŠKO DELO**

Uredništvo vsak prispeli članek pregleda. Nato vsebino prispevka oceni strokovni recenzent, ki avtorjem ni znan, prav tako strokovni recenzent ni seznanjen z identiteto avtorjev. Članek da uredništvo v pregled tudi lektorju za slovenski jezik, izvleček v angleškem jeziku pa lektorju za angleški jezik. Avtor na koncu dobi vpogled prve krtačne odtise, vendar na tej stopnji upoštevamo samo popravke tiskarskih napak. Krtačne odtise morate vrniti v treh dneh, sicer menimo, da se s popravki strinjate.





## Medicinski razgledi

Medicinski pregledni, strokovni in raziskovalni članki

### Glavni urednik

Klemen Žiberna

### Odgovorna urednica

Nina Hojs

### Tehnični uredniki

Luka Kristanc, Bogdan Vidmar,

Nena Golob

### Uredniški odbor

Petra Bavčar, Črt Jamšek, Kaja Jamšek,  
Miodrag Janić, Anja Kokalj, Urša Mikuž,  
Katja Stopar, Nina Rink, Tomaž Rus,  
Ana Šubic, Orjana Velikonja,  
Manca Velkavrh, Marta Žnidaršič

### Lektorji

Katarina Grabnar, Matej Klemen, Mateja  
Hočevar Gregorič

### Lektor za angleški jezik

Ksenija Davidovič

### Naslov uredništva

Medicinski razgledi  
Korytkova 2, 1000 Ljubljana  
Tel., faks: (01) 52 42 356  
<http://www.medrazgl.si>  
E-pošta: [info@medrazgl.si](mailto:info@medrazgl.si)

**POR: 02014-0050652588**

### Ključne besede

Inštitut za biomedicinsko informatiko,  
Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

### To revijo indeksirajo in/ali abstrahirajo

Biological Abstracts  
Biomedicina Slovenica  
Bowker International  
Chemical Abstract  
Nutritional Abstracts

### Številko so sofinancirali

Javna agencija za knjigo  
Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani  
Študentska organizacija Univerze v Ljubljani

### Prelom

SYNCOMP d. o. o.

### Tisk

Tiskarna Pleško d. o. o., Rožna dolina  
cesta IV/32-34, 1000 Ljubljana

### Fotografija na naslovnici

Petra Bavčar

---

Medicinski razgledi izhajajo štirikrat letno v 2100 izvodih. Cena izvoda je 6 €, za ustanove 10 €, za študente 4 €.

## Copyright © Medicinski razgledi 2010

Vse pravice pridržane. Razmnoževanje ali razširjanje posameznih delov ali celote te publikacije s katerim koli sredstvom brez pisanega privoljenja založbe je prepovedano.

## Medicinski razgledi

Medical Review, Professional and Research Articles

### Editor-in-Chief

Klemen Žiberna

### Editor

Nina Hojs

### Production Editors

Luka Kristanc, Bogdan Vidmar,  
Nena Golob

### Editorial Board

Petra Bavčar, Črt Jamšek, Kaja Jamšek,  
Miodrag Janić, Anja Kokalj, Urša Mikuž,  
Katja Počkar, Nina Rink, Tomaž Rus,  
Ana Šubic, Orjana Velikonja,  
Manca Velkavrh, Marta Žnidaršič

### Readers for Slovenian

Katarina Grabnar, Matej Klemen, Mateja  
Hočevcar Gregorič

### Reader for English

Ksenija Davidovič

### Address

Medicinski razgledi  
Korytkova 2, 1000 Ljubljana  
Tel., fax: (01) 52 42 356  
<http://www.medrazgl.si>  
E-pošta: [info@medrazgl.si](mailto:info@medrazgl.si)

**POR: 02014-0050652588**

### Key Words

Institute for Biomedical Informatics,  
Faculty of Medicine, University of Ljubljana

### The Journal is Abstracted/Indexed by

Biological Abstracts  
Biomedicina Slovenica  
Bowker International  
Chemical Abstract  
Nutritional Abstracts

### The Issue is Subsidised by

Slovenian Book Agency  
Faculty of Medicine, University of Ljubljana  
Student Organization, University of Ljubljana

### D. T. P.

SYNCOMP d. o. o.

### Printed by

Tiskarna Pleško d. o. o., Rožna dolina  
cesta IV / 32-34, 1000 Ljubljana

### Front Cover

Petra Bavčar

---

Medicinski razgledi issues four times a year. Printed in 2100 copies. The students price is 4 €, regular price for non-students 6 €, institutions 10 €.

### Copyright © Medicinski razgledi 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means without permission in writing from the publisher.



From 1–126

Pages

	Editorial ◀	1
The Effect of Tactile Stimulation on Physiological Parameters, Behavioural Response and Phase Adjustment of Rest-activity Rhythms in Newborn Infants – Ana Drole Torkar, Darja Paro Panjan	◀	3
Biologic Drugs in Asthma Treatment – Vojko Berce, Ivan Krajnc, Uroš Potočnik	◀	11
Cytopathologic Diagnosis of Bladder Cancer in Urine and Bladder Washings – Margareta Strojan Fležar	◀	19
Bioterrorism – Tatjana Pokrajac	◀	33
A Symphony of Maladies – Occupational Diseases in Musicians – Nina Hojs, Marjan Bilban	◀	43
Tight Junction Barriers in Our Body – Kristijan Jezernik, Mateja Erdani Kreft	◀	51
Molecular Mechanisms of Metastasis – Petra Hudler	◀	63
Autophagy and its Role in Health and in Sickness – Andreja Erman, Kristijan Jezernik	◀	77
Subcutaneous Emphysema of the Neck and Pneumomediastinum Following Isolated Facial Trauma – Jože Vogelcnik, Vojko Didanovič, Andrej A. Kansky	◀	89
Childhood Nephrotic Syndrome – Case Report – Maja Pavčnik -Arnol, Rina Rus	◀	97
	Reports ◀	107
	News ◀	113
	List of graduated students ◀	121